

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 09.03.95.

30 Priorité :

43 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 13.09.96 Bulletin 96/37.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : BIO MERIEUX SOCIETE ANONYME
— FR.

72 Inventeur(s) : PERRON HERVE, MANDRAND
BERNARD, MALLET FRANCOIS, BEDIN FREDERIC
et BESEME FREDERIC.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire : GERMAIN ET MAUREAU.

54 VIRUS MSRV-1 ET AGENT PATHOGENE ET/OU INFECTANT MSRV-2 ASSOCIES A LA POLYARTHRITE
RHUMATOIDE.

57 L'invention concerne l'utilisation d'un matériel viral, à l'état purifié ou isolé, possédant une activité transcriptase inverse, apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et/ou d'un agent pathogène et/ou infectant, à l'état purifié ou isolé, différent du matériel viral précité, chacun étant issu d'une souche virale possédant une activité transcriptase inverse, choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et parmi leurs souches variantes consistant en des virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit matériel viral et/ou ledit agent pathogène et/ou infectieux, associés à la polyarthrite rhumatoïde.

FR 2 731 356 - A1



La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires humains et sa prévalence est particulièrement élevée : 3% (1). Le diagnostic en est malaisé à son début : son hétérogénéité clinique ainsi que les symptômes extra-articulaires associés à des anomalies immunologiques parfois importantes, viennent compliquer le tableau. Il s'agit d'une maladie d'étiologie encore inconnue qui est classée dans la catégorie des maladies "autoimmunes" du fait de l'existence de réactions immunologiques exacerbées contre des auto-antigènes.

Une étiologie virale et/ou bactérienne de la PR a été régulièrement invoquée mais la recherche d'un agent causal de la PR n'a pas abouti à ce jour (2).

Les concepts définissant la PR comme une maladie auto-immune et ceux qui étayaient une hypothèse étiologique virale, voire bactérienne, peuvent maintenant se rejoindre dans la compréhension des différents mécanismes par lesquels un micro-organisme peut induire une réaction auto-immune chez l'hôte infecté, comme cela a été décrit par Fujinami R.S. et Oldstone M.B.A. (3). Des molécules d'origine bactérienne ou virale, voire rétrovirale endogène, sont connues pour posséder des propriétés dites superantigéniques (4,5). Leurs propriétés particulières de stimulation directe des lymphocytes T, spécifiques d'antigènes différents, par liaison avec la région V β de certains récepteurs "T", ont fait évoquer l'hypothèse que de telles molécules soient intimement associées au processus étiopathogénique des pathologies autoimmunes (6). Pourtant, aucun agent pathogène spécifique, bactérien ou viral, et éventuellement producteur de superantigène, n'a encore été clairement associé à la polyarthrite rhumatoïde.

Les travaux de la Demanderesse, dans la recherche d'une étiologie de la PR l'ont conduite aujourd'hui à la découverte de l'existence de deux agents pathologiques

et/ou infectants, associés, indépendamment ou ensemble, aux états pathologiques de la PR.

Les techniques de culture et de détection de matériel rétroviral mises en oeuvre dans les travaux réalisés par la Demanderesse sur un agent associé à la sclérose en plaques (SEP) et décrits dans les demandes de brevet français 92 04322, 92 13447, 92 13443, 92 01529, 94 01530, 94 01531, 94 01532 et dans la publication de H. PERRON et coll. (7) (dont le contenu est incorporé par référence à la présente description), ont permis de mettre en évidence, de manière totalement inattendue, l'identité entre des agents associés à la SEP et ceux qui font l'objet de la présente invention, associés à la PR.

Etant donné que, dans la PR, le processus a lieu au niveau de l'articulation et implique plus particulièrement la synoviale, on a réalisé des cultures de cellules dérivées de liquide synovial ponctionné dans des articulations affectées de patients atteints de PR. A partir d'une telle culture, on a pu obtenir des cellules de type fibroblastique qui ont proliféré in vitro, permettant ainsi de réaliser quelques passages. Les milieux de culture correspondants ont été utilisés pour une recherche d'activité transcriptase inverse associée à des particules infectantes concentrées par ultracentrifugation puis purifiées sur gradient isopycnique. L'utilisation des conditions de détection mises au point pour la souche LM7 issue de SEP (7), a permis de détecter une activité transcriptase inverse significative dans quelques fractions individualisées d'un tel gradient. Par la suite, l'analyse des séquences nucléiques amplifiées dans ces fractions par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction), avec des amorces dégénérées analogues aux séquences consensus des enzymes à activité transcriptase inverse (8) a révélé la présence de séquences significatives identiques aux séquences des agents pathogènes et/ou infectieux MSRV1 et MSRV2,

précédemment identifiées dans les cultures issues de cas de sclérose en plaques.

Ainsi, les différents objets de la présente invention sont les suivants:

5 i) l'utilisation d'un matériel viral, à l'état purifié ou isolé, possédant une activité transcriptase inverse, apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, issu d'une souche virale possédant une activité transcriptase inverse, choisie parmi les souches dénommées
10 respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et parmi leurs souches variantes, les souches variantes consistant en des virus comprenant au moins un
15 antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un -ou l'autre des virus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou
20 traiter une infection par ledit matériel viral ou une réactivation dudit matériel viral, associé à la polyarthrite rhumatoïde,

 ii) l'utilisation d'un matériel viral, à l'état purifié ou isolé, possédant une activité transcriptase
25 inverse, apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, produit par une lignée cellulaire choisie parmi les lignées dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201, et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC
30 sous le numéro d'accès 93010817, ou par toute culture cellulaire infectée susceptible de produire un virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus produits par
35 les lignées PLI-2 et LM7PC précitées, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique

pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit matériel viral ou une réactivation dudit matériel viral, associé à la polyarthrite rhumatoïde,

iii) l'utilisation d'un matériel viral dont le
5 génome comprend une séquence nucléotidique choisie parmi
SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04,
SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08,
SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043 leurs
séquences complémentaires, et leurs séquences
10 équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques
présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au
moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie
avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01,
SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05,
15 SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09,
SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043 et leurs séquences
complémentaires, pour obtenir une composition
diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour
détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit
20 matériel viral ou une réactivation dudit matériel viral,
associé à la polyarthrite rhumatoïde,

iv) l'utilisation d'un matériel rétroviral, dont
le gène pol de son génome comprend une séquence
nucléotidique équivalente, et notamment présentant au
25 moins 50% d'homologie, de préférence au moins 65%
d'homologie, avec une séquence nucléotidique appartenant
au gène pol du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9, pour
obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou
thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une
30 infection par ledit matériel viral ou une réactivation
dudit matériel viral, associé à la polyarthrite
rhumatoïde,

v) l'utilisation d'un matériel rétroviral dont le
gène pol de son génome code pour une séquence peptidique
35 présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70%
d'homologie avec une séquence peptidique codée par le gène

pol du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit matériel viral ou une réactivation dudit matériel viral, associé à la polyarthrite rhumatoïde,

vi) l'utilisation d'un matériel rétroviral dont le gène *pol* de son génome code pour une séquence peptidique présentant, pour toute suite contigue d'au moins 30 acides aminés, au moins 50% et de préférence au moins 70% d'homologie avec une séquence peptidique codée par une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043, et leurs séquences complémentaires, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit matériel viral ou une réactivation dudit matériel viral, associé à la polyarthrite rhumatoïde,

vii) l'utilisation d'un fragment nucléotidique, dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50%, et de préférence au moins 70% d'homologie, avec une séquence choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043 et leurs séquences complémentaires, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit

matériel viral ou une réactivation dudit matériel viral, associé à la polyarthrite rhumatoïde,

viii) l'utilisation d'une amorce spécifique comprenant une séquence nucléotidique identique ou
5 équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment défini en vii), notamment une séquence nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au moins 70% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment, pour l'amplification par
10 polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un matériel viral associé à la polyarthrite rhumatoïde ; selon une utilisation préférentielle, l'amorce comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021,
15 SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025, SEQ ID N026, SEQ ID N031, SEQ ID N032, SEQ ID N033, SEQ ID N047, SEQ ID N048, SEQ ID N049 et leurs séquences complémentaires,

ix) l'utilisation d'une sonde comprenant une
20 séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment défini en vii), notamment une séquence nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au moins 70% d'homologie avec au moins une partie dudit
25 fragment pour obtenir une composition pour détecter, séparer, ou identifier, dans un échantillon biologique, un matériel viral ou une réactivation dudit matériel viral, associé à la polyarthrite rhumatoïde ; selon une utilisation préférentielle, la sonde comprend une séquence
30 nucléotidique choisie parmi SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025, SEQ ID N026, SEQ ID N031, SEQ ID N032,
35 SEQ ID N033, SEQ ID N047, SEQ ID N048, SEQ ID N049 et leurs séquences complémentaires,

x) l'utilisation d'un agent pathogène et/ou infectant, à l'état purifié ou isolé, différent du matériel viral défini à l'un quelconque des points i) à vi), issu d'une souche virale choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202 et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et parmi leurs souches variantes, consistant en des agents pathogènes et/ou infectants comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants des souches virales POL-2 et MS7PG précitées, respectivement différents de l'un ou l'autre matériel rétroviral desdites souches, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit agent pathogène et/ou infectant ou une réactivation dudit agent pathogène et/ou infectant, associé à la polyarthrite rhumatoïde,

xi) l'utilisation d'un agent pathogène et/ou infectant, à l'état purifié ou isolé, différent du matériel viral défini à l'un quelconque des points i) à vi), produit par une lignée cellulaire choisie parmi les lignées dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201 et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, et par toutes cultures cellulaires infectées susceptibles de produire au moins l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants, et/ou leurs variants, ou par toute culture cellulaire infectée susceptible de produire un agent pathogène et/ou infectant comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants produits par les lignées PLI-2

et LM7PC précitées, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit agent pathogène et/ou infectant ou une réactivation dudit agent pathogène et/ou infectant, associé à la polyarthrite rhumatoïde,

xii) l'utilisation d'un agent pathogène et/ou infectant comprenant un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques, présentant au moins 70% et préférentiellement au moins 90% d'homologie avec une séquence nucléotidique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, et leurs séquences complémentaires, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit agent pathogène et/ou infectant ou une réactivation dudit agent pathogène et/ou infectant, associé à la polyarthrite rhumatoïde,

xiii) l'utilisation d'un fragment nucléotidique, comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70%, et de préférence au moins 90% d'homologie, avec une séquence choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, et leurs séquences complémentaires, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit agent pathogène et/ou infectant ou une réactivation dudit agent pathogène et/ou infectant, associé à la polyarthrite rhumatoïde,

xiv) l'utilisation d'une amorce comprenant une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment défini en xiii), notamment une séquence nucléotidique
 5 présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au moins 90% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment, pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un agent pathogène et/ou infectant associé à la polyarthrite rhumatoïde ; selon une utilisation
 10 avantageuse, l'amorce comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N027, SEQ ID N028, SEQ ID N029, SEQ ID N030, SEQ ID N034, SEQ ID N035, SEQ ID N036, SEQ ID N037, SEQ ID N044, SEQ ID N045, SEQ ID N046, et leurs séquences
 15 complémentaires,

xv) l'utilisation d'une sonde comprenant une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment défini en xiii), notamment une séquence nucléotidique
 20 présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au moins 90% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit agent pathogène et/ou
 25 infectant ou une réactivation dudit agent pathogène et/ou infectant, associé à la polyarthrite rhumatoïde ; selon une utilisation avantageuse, la sonde comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N027, SEQ ID N028, SEQ ID N029, SEQ ID N030, SEQ ID N034, SEQ ID N035, SEQ ID N036, SEQ ID N037, SEQ ID N044, SEQ ID N045, SEQ ID N046 et leurs séquences
 30 complémentaires,

* page 9 bis
 xvi) l'utilisation d'une association ^{ou composition} comprenant
 35 deux agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé ou purifié, à savoir, un premier agent qui consiste en un

9 bis

La présente invention a également pour objet de nouveaux polynucléotides et oligonucléotides dont la séquence nucléotidique de chacun est identique à l'une quelconque des séquences SEQ ID N039 à SEQ ID N049.

virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents
5 pathogènes et/ou infectants étant issus d'une même souche virale choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202 et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et
10 parmi leurs souches variantes, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou traiter une infection par un premier agent pathogène et/ou infectant, et un second agent pathogène et/ou infectant, associés à la
15 polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation de l'un ou l'autre dudit premier agent et dudit second agent,

xii) l'utilisation d'une association comprenant deux agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé ou purifié, à savoir, un premier agent consistant en un virus
20 humain possédant une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant produits par une même lignée
25 cellulaire choisie parmi les lignées dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201 et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, et par toutes cultures cellulaires infectées
30 susceptibles de produire au moins l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants, et/ou leurs variants, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou traiter une infection par un premier agent pathogène et/ou infectant,
35 et un second agent pathogène et/ou infectant, associés à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation de l'un ou

l'autre dudit premier agent et dudit second agent,

xiii) l'utilisation d'une association comprenant deux agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé ou purifié, à savoir un premier agent consistant en un virus, ou un variant dudit virus, dont le génome comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50% et préférentiellement au moins 70% d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043, et leurs séquences complémentaires, et un second agent pathogène et/ou infectant, dont le génome comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, et SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70% et préférentiellement au moins 90% d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, et leurs séquences complémentaires, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une infection par un premier agent pathogène et/ou infectant, et un second agent pathogène et/ou infectant, associés à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation de l'un ou l'autre dudit premier agent et dudit second agent,

xix) l'utilisation d'une association de fragments nucléotidiques comprenant un premier fragment dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique

choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043, leurs séquences complémentaires, et leurs
5 séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50% et de préférence au moins 70% d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04,
10 SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043, et leurs séquences complémentaires, et un second fragment dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011,
15 SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70% et de préférence au moins 90% d'homologie avec une séquence
20 nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, et leurs séquences complémentaires, chacun desdits fragments étant notamment une sonde, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter un premier
25 agent pathogène et/ou infectant, et un second agent pathogène et/ou infectant, associés à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation de l'un ou l'autre dudit premier agent et dudit second agent,

xx) l'utilisation d'une association comprenant un
30 premier polypeptide codé de manière partielle ou totale par le premier fragment nucléotidique défini en ix), et un second polypeptide codé de manière partielle ou totale par le deuxième fragment nucléotidique défini en ix), pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou
35 thérapeutique, pour détecter un premier agent pathogène et/ou infectant, et un second agent pathogène et/ou

infectant, associés à la polyarthrite rhumatoïde ; selon une utilisation avantageuse, cette association comprend un premier ligand, notamment anticorps, spécifique du premier polypeptide, et un second ligand, notamment anticorps, spécifique du second polypeptide, lesdits premier et second polypeptides étant définis ci-dessus,

xxi) un procédé d'obtention d'un premier agent pathogène et/ou infectant défini à l'un quelconque des points i) à vi) et/ou d'un second agent pathogène et/ou infectant défini à l'un quelconque des points x) à xii), associés à la polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce qu'on cultive in vitro des cellules de ponctions de liquide synovial notamment choisies parmi les synoviocytes et les fibroblastes desquamés de liquide articulaire, de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde,

xxii) un procédé d'obtention d'un premier agent pathogène et/ou infectant défini à l'un quelconque des points i) à vi) et/ou d'un second agent pathogène et/ou infectant défini à l'un quelconque des points x) à xii), associés à la polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce qu'on cultive in vitro des cellules lymphocytaires B immortalisées par le virus d'Epstein-Barr, de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.

Avant de détailler l'invention, différents termes utilisés dans la description et les revendications sont à présent définis :

- par souche ou isolat, on entend toute fraction biologique infectante et/ou pathogène, contenant par exemple des virus et/ou des bactéries et/ou des parasites, et générant un pouvoir pathogène et/ou antigénique, hébergée par une culture ou un hôte vivant ; à titre d'exemple; une souche virale selon la définition précédente peut contenir un agent co-infectant, par exemple un protiste pathogène,

- le terme "MSRV" utilisé dans la présente description désigne tout agent pathogène et/ou infectant,

associé à la SEP ou à la PR, notamment une espèce virale, les souches atténuées de ladite espèce virale, ou les particules défectives interférentes dérivées de cette espèce. Il est connu que les virus et particulièrement les virus contenant de l'ARN ont une variabilité, consécutive notamment à des taux relativement élevés de mutation spontanée (9), dont il sera tenu compte ci-après pour définir la notion d'équivalence,

- par virus humain, on entend un virus susceptible d'infecter l'être humain,

- compte tenu de toutes les variations naturelles ou induites, pouvant être rencontrées dans la pratique de la présente invention, les objets de cette dernière, définis ci-dessus et dans les revendications, ont été exprimés en comprenant les équivalents ou dérivés des différents matériels biologiques définis ci-après, notamment des séquences homologues nucléotidiques ou peptidiques,

- le variant d'un virus ou d'un agent pathogène et/ou infectant selon l'invention, comprend au moins un antigène reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant dudit virus et/ou dudit agent pathogène et/ou infectant, et/ou un génome dont toute partie est détectée par au moins une sonde d'hybridation, et/ou au moins une amorce d'amplification nucléotidique spécifique dudit virus et/ou agent pathogène et/ou infectant, comme par exemple celles ayant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013 à SEQ ID N038, et SEQ ID N044 à SEQ ID N049, et leurs séquences complémentaires, dans des conditions d'hybridation déterminées bien connues de l'homme de l'art,

- selon l'invention, un fragment nucléotidique ou un oligonucléotide ou un polynucléotide est un enchaînement de monomères, ou un biopolymère, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques

naturels, susceptibles de s'hybrider à tout autre fragment nucléotidique dans des conditions prédéterminées, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures chimiques différentes et être obtenu à partir
5 d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

- ainsi un monomère peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique, dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée;
10 dans l'ARN le sucre est le ribose, dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose; selon qu'il s'agit de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine; ou le nucléotide peut être modifié dans l'un au moins des trois éléments
15 constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-
20 désoxyuridine et toute autre base modifiée favorisant l'hybridation; au niveau du sucre, la modification peut consister dans le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (10), et au niveau du groupement phosphate, la modification peut consister dans son
25 remplacement par des esters, notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de phosphorothioate,

- par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de monomères, dont la nature chimique et
30 l'ordre dans un sens de référence, constituent ou non une information fonctionnelle de même qualité que celle des acides nucléiques naturels,

- par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions opératoires appropriées, deux
35 fragments nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires, s'apparient pour former un brin multiple,

notamment double ou triple, de préférence sous forme d'hélice,

- une sonde comprend un fragment nucléotidique synthétisé par voie chimique ou obtenu par digestion ou
5 coupure enzymatique d'un fragment nucléotidique plus long, comprenant au moins six monomères, avantageusement de 10 à 100 monomères, de préférence 10 à 30 monomères, et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées ; de préférence, une sonde
10 possédant moins de 10 monomères n'est pas utilisée seule, mais l'est en présence d'autres sondes de taille aussi courte ou non ; dans certaines conditions particulières, il peut être utile d'utiliser des sondes plus longues, par exemple de taille supérieure à 100 monomères ; une sonde
15 peut notamment être utilisée à des fins de diagnostic et il s'agira par exemple de sondes de capture et/ou de détection,

- la sonde de capture peut être immobilisée sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire
20 directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption passive,

- la sonde de détection peut être marquée au moyen d'un marqueur choisi notamment parmi les isotopes radioactifs, des enzymes notamment choisis parmi la
25 peroxydase et la phosphatase alcaline et ceux susceptibles d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et la biotine,

30 - les sondes utilisées à des fins de diagnostic de l'invention peuvent être mises en oeuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues et notamment les techniques dites "DOT-BLOT" (11), "SOUTHERN BLOT" (12), "NORTHERN BLOT" qui est une technique identique à la
35 technique "SOUTHERN BLOT" mais qui utilise de l'ARN comme cible, la technique SANDWICH (13); avantageusement, on

utilise la technique SANDWICH dans la présente invention, comprenant une sonde de capture spécifique et/ou une sonde de détection spécifique, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent présenter une
5 séquence nucléotidique au moins partiellement différente,

- l'invention couvre également une sonde susceptible de s'hybrider in vivo ou in vitro sur l'ARN et/ou sur l'ADN, pour bloquer les phénomènes de répllication, notamment traduction et/ou transcription,
10 et/ou pour dégrader ledit ADN et/ou ARN,

- une amorce est une sonde comprenant au moins six monomères, et avantageusement de 10 à 30 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées, pour l'initiation d'une
15 polymérisation enzymatique par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé d'élongation, tel que le séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou analogue,

- deux séquences nucléotidiques ou peptidiques sont dites équivalentes ou dérivées l'une par rapport à l'autre, ou par rapport à une séquence de référence, si fonctionnellement les biopolymères correspondants peuvent jouer sensiblement le même rôle, sans être identiques,
25 vis-à-vis de l'application ou utilisation considérée, ou dans la technique dans laquelle elles interviennent ; sont notamment équivalentes deux séquences obtenues du fait de la variabilité naturelle, notamment mutation spontanée de l'espèce à partir de laquelle elles ont été identifiées,
30 ou induite, ainsi que des séquences homologues, l'homologie étant définie ci-après,

- par variabilité, on entend toute modification, spontanée ou induite d'une séquence, notamment par substitution, et/ou insertion, et/ou délétion de
35 nucléotides et/ou de fragments nucléotidiques, et/ou extension et/ou raccourcissement de la séquence à l'une au

moins des extrémités ; une variabilité non naturelle peut résulter des techniques de génie génétique utilisées, par exemple du choix des amorces de synthèse dégénérées ou non, retenues pour amplifier un acide nucléique; cette
5 variabilité peut se traduire par des modifications de toute séquence de départ, considérée comme référence, et pouvant être exprimées par un degré d'homologie par rapport à ladite séquence de référence,

- l'homologie caractérise le degré d'identité de
10 deux fragments nucléotidiques ou peptidiques comparés; elle se mesure par le pourcentage d'identité qui est notamment déterminé par comparaison directe de séquences nucléotidiques ou peptidiques, par rapport à des séquences nucléotidiques ou peptidiques de référence,

15 - ce pourcentage d'identité a été spécifiquement déterminé pour les fragments nucléotidiques relevant de la présente invention, homologues aux fragments identifiés par SEQ ID N01 à SEQ ID N09 et SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043, (MSRV-1) d'une part, et ceux homologues aux
20 fragments identifiés, par SEQ ID N010 à SEQ ID N012, et SEQ ID N040 à SEQ ID N043 (MSRV-2), d'autre part, ainsi que pour les sondes et amorces homologues aux sondes et amorces identifiées par SEQ ID N016 à SEQ ID N026, SEQ ID N031 à SEQ ID N033, et SEQ ID N047 à SEQ ID N049,
25 d'une part, et aux sondes et amorces identifiées par SEQ ID N013 à N015, SEQ ID N027 à SEQ ID N030, SEQ ID N034 à N037, et SEQ ID N044 à N046, d'autre part ; à titre d'exemple, le plus faible pourcentage d'identité observé entre les différents consensus généraux en acides
30 nucléiques obtenus à partir de fragments d'ARN viral de MSRV-1, issu des lignées LM7PC et PLI-2 selon un protocole détaillé plus loin, est de 67% dans la région décrite à la figure 2,

- tout fragment nucléotidique est dit équivalent
35 ou dérivé d'un fragment de référence, s'il présente une séquence nucléotidique équivalente à la séquence de

référence ; selon la définition précédente, sont notamment équivalents à un fragment nucléotidique de référence :

a) tout fragment susceptible de s'hybrider au moins partiellement avec le complément du fragment de
5 référence

b) tout fragment dont l'alignement avec le fragment de référence conduit à mettre en évidence des bases contigues identiques, en nombre plus important qu'avec tout autre fragment provenant d'un autre groupe
10 taxonomique

c) tout fragment résultant ou pouvant résulter de la variabilité naturelle de l'espèce, à partir de laquelle il est obtenu

d) tout fragment pouvant résulter des techniques
15 de génie génétique appliquées au fragment de référence

e) tout fragment, comportant au moins huit nucléotides contigus, codant un peptide homologue ou identique au peptide codé par le fragment de référence,

f) tout fragment différent du fragment de
20 référence, par insertion, délétion, substitution d'au moins un monomère, extension, ou raccourcissement à l'une au moins de ses extrémités; par exemple tout fragment correspondant au fragment de référence flanqué à l'une au moins de ses extrémités par une séquence nucléotidique ne
25 codant pas pour un polypeptide,

- par polypeptide, on entend notamment tout peptide d'au moins deux acides aminés, notamment oligopeptide, protéine, extrait, séparé, ou substantiellement isolé ou synthétisé, par l'intervention
30 de la main de l'homme, notamment ceux obtenus par synthèse chimique, ou par expression dans un organisme recombinant,

- par polypeptide codé de manière partielle par un fragment nucléotidique, on entend un polypeptide présentant au moins 3 acides aminés codés par au moins 9
35 monomères contigus compris dans ledit fragment nucléotidique,

- un acide aminé est dit analogue à un autre acide aminé, lorsque leurs caractéristiques physico-chimiques respectives, telles que polarité, hydrophobicité, et/ou basicité, et/ou acidité, et/ou neutralité, sont
5 sensiblement les mêmes; ainsi, une leucine est analogue à une isoleucine.

- tout polypeptide est dit équivalent ou dérivé d'un polypeptide de référence, si les polypeptides comparés ont sensiblement les mêmes propriétés, et
10 notamment les mêmes propriétés antigéniques, immunologiques, enzymologiques et/ou de reconnaissance moléculaire ; est notamment équivalent à un polypeptide de référence :

a) tout polypeptide possédant une séquence dont au
15 moins un acide aminé a été substitué par un acide aminé analogue,

b) tout polypeptide ayant une séquence peptidique équivalente, obtenue par variation naturelle ou induite dudit polypeptide de référence, et/ou du fragment
20 nucléotidique codant pour ledit polypeptide,

c) un mimotope dudit polypeptide de référence,

d) tout polypeptide dans la séquence duquel un ou plusieurs acides aminés de la série L sont remplacés par un acide aminé de la série D, et vice versa,

25 e) tout polypeptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH, et avantageusement toutes les liaisons CO-NH, de la chaîne peptidique du peptide parent correspondant, (ne comportant pas de liaison NH-CO dans sa chaîne peptidique), est (sont) remplacée(s) par une (des)
30 liaison(s) NH-CO,

f) tout polypeptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH, et avantageusement toutes les liaisons CO-NH, de la chaîne peptidique du peptide parent correspondant, (ne comportant pas de liaison NH-CO dans sa
35 chaîne peptidique), est (sont) remplacée(s) par une (des) liaison(s) NH-CO, la chiralité de chaque résidu

aminoacyle, qu'il soit impliqué ou non dans une ou plusieurs liaisons CO-NH sus-mentionnées, étant soit conservée, soit inversée par rapport aux résidus aminoacyles correspondants constituant ledit peptide
5 parent, ces composés du type peptidique étant encore désignés immunorétroïdes,

g) tout polypeptide dans la séquence duquel on a introduit une modification des chaînes latérales des acides aminés, telle que par exemple une acétylation des
10 fonctions amines, une carboxylation des fonctions thiol, une estérification des fonctions carboxyliques,

h) tout polypeptide dans la séquence duquel une ou des liaisons peptidiques ont été modifiées comme par exemple les liaisons carba, rétro, inverso, rétro-inverso,
15 réduites, et méthylène-oxy.

i) tout polypeptide dont au moins un antigène est reconnu par un antigène du polypeptide de référence,

- le pourcentage d'identité caractérisant l'homologie de deux fragments peptidiques comparés est
20 selon la présente invention d'au moins 50% et de préférence au moins 70%.

Etant donné qu'un virus possédant une activité enzymatique transcriptase inverse peut être génétiquement caractérisé aussi bien sous forme d'ARN que d'ADN, il sera
25 fait mention aussi bien de l'ADN que de l'ARN viral pour caractériser les séquences relatives à un virus possédant une telle activité transcriptase inverse (MSRV-1).

Etant donné que l'agent pathogène et/ou infectant (MSRV)-2 a été détecté tant en ADN qu'en ARN dans les
30 cellules infectées, il peut également être caractérisé sous forme d'ADN ou ARN.

Les expressions d'ordre utilisées dans la présente description et les revendications, telles que "première séquence nucléotidique" ne sont pas retenues pour exprimer
35 un ordre particulier, mais pour définir plus clairement l'invention.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre faite en référence aux figures annexées dans lesquelles:

- 5 - la figure 1 représente la séquence de type MSRV-2A obtenue à partir des cultures LM7 selon le protocole de Shih (8) ; cette séquence est identifiée sous la référence SEQ ID N010,
- 10 - la figure 2 représente des consensus généraux en acides nucléiques des séquences MSRV-1B amplifiées par la technique PCR dans la région "pol", à partir d'ADN viral issu des lignées LM7PC et PLI-2, identifiés sous les références SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, et SEQ ID N06, et le consensus commun avec amorces d'amplification portant la référence SEQ ID N07,
- 15 - la figure 3 représente l'arbre phylogénétique des séquences de type MSRV-1B obtenues par PCR dans la région "pol" définie par Shih (8),
- la figure 4 donne la définition d'une trame de lecture fonctionnelle pour chaque famille de type MSRV-1B/"PCR pol", lesdites familles A à D étant définies respectivement par les séquences nucléotidiques SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, et SEQ ID N06, décrites à la figure 2,
- 20 - la figure 5 donne un exemple de consensus des séquences de MSRV-2B, identifié par SEQ ID N011,
- la figure 6 représente la séquence nucléotidique du clone PSJ17 (SEQ ID N09),
- la figure 7 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N08, du clone dénommé M003-P004,
- 30 - la figure 8 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N02 du clone F11-1; la partie repérée entre deux flèches dans la région de l'amorce correspond à une variabilité imposée par le choix de l'amorce ayant servi au clonage de F11-1; sur cette même figure, la traduction en acides aminés est représentée,
- 35 - la figure 9 représente la séquence nucléotidique

SEQ ID N01, et une trame fonctionnelle de lecture possible en acides aminés de SEQ ID N01; sur cette séquence, les séquences consensus des transcriptases inverses rétrovirales sont soulignées,

- 5 - la figure 10 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N012 du clone dénommé MSRV2EL1,
- la figure 11 décomposée en trois planches successives 11/23 à 13/23 représente la traduction en acides aminés de SEQ ID N012, incluant l'amorce
- 10 SEQ ID N013, selon 6 trames de lecture possibles,
- la figure 12 présente un alignement de la séquence MSRV2-A (SEQ ID N010) sur la séquence MSRV2-EL1 (SEQ ID N012); sur cette même représentation, la région d'hybridation de l'amorce identifiée sous la référence
- 15 SEQ ID N013, (hormis la queue de clonage) est encadrée; celle de l'amorce identifiée sous la référence SEQ ID N014, est signalée entre des crochets,
- la figure 13 représente la mesure de l'activité transcriptase inverse avec les conditions définies dans
- 20 l'exemple 7, dans les fractions d'un gradient de saccharose où a été réalisée une sédimentation à l'équilibre d'agents infectants et/ou pathogènes présents dans le surnageant de cultures de cellules de liquides articulaires de polyarthrite rhumatoïde, ainsi que cela
- 25 est décrit dans l'exemple 7 ; la courbe représente les variations de l'activité transcriptase inverse dans les différentes fractions du gradient ; cette activité est mesurée en DPM (désintégrations par minute) sur l'axe des ordonnées ; l'axe des abscisses représente les fractions
- 30 collectées sur le gradient par ordre de densité croissante (fractions 1 à 10),
- la figure 14, divisée en figures 14A, 14B et 14C, montre, selon la figure 14A, la séquence du clone "MSRV-1polPR" identifiée par SEQ ID N039, obtenu sur
- 35 échantillon de PR dans les conditions définies dans l'exemple 9, selon les figures 14B et 14C, l'alignement de

la séquence de ce clone avec les SEQ ID N01 et SEQ ID N06, respectivement, correspondant à des séquences du rétrovirus MSRV-1 obtenues dans des échantillons provenant de SEP,

5 - la figure 15, divisée en figures 15A, 15B et 15C, montre, selon la figure 15A, la séquence du clone "MSRV2sPR" identifiée par SEQ ID N040, obtenu sur échantillon de PR dans les conditions définies dans l'exemple 9, selon les figures 15B et 15C, l'alignement de
10 la séquence de ce clone avec les SEQ ID N010 et SEQ ID N012, respectivement, correspondant à des séquences de l'agent infectant MSRV-2 obtenues dans des échantillons provenant de SEP,

 - la figure 16 montre la séquence du clone
15 MSRV2cPR identifiée par SEQ ID N041, obtenu à partir de cellules d'un liquide articulaire de PR, dans les conditions définies dans l'exemple 10,

 - la figure 17 montre la séquence du clone MSRV2cPR identifiée par SEQ ID N041, obtenu à partir de
20 cellules d'un liquide articulaire de PR, et l'alignement de la partie terminale (654-705) de la séquence de ce clone avec la SEQ ID N010, correspondant à une séquence de l'agent infectant MSRV-2 obtenue dans des échantillons provenant de SEP,

25 - la figure 18 montre la séquence du clone MSRV2cPR identifiée par SEQ ID N041, obtenu à partir de cellules d'un liquide articulaire de PR, et l'alignement de la séquence de ce clone avec la SEQ ID N012, correspondant à une séquence de l'agent infectant MSRV-2
30 obtenue dans des échantillons provenant de SEP,

 - la figure 19 montre la séquence du clone MSRV1nPR identifiée par SEQ ID N042, obtenu à partir d'un liquide articulaire de PR, dans les conditions définies dans l'exemple 10,

35 - la figure 20 montre la séquence du clone MSRV1nPR identifiée par SEQ ID N043, obtenu à partir de

cellules d'un liquide articulaire de PR, et l'alignement de la séquence de ce clone avec la SEQ ID N01, correspondant à une séquence du rétrovirus MSRV-1 obtenue à partir d'échantillons provenant de SEP.

5

EXEMPLE 1: OBTENTION DE CLONES MSRV-2 DENOMMES MSRV-2A, PAR AMPLIFICATION DES REGIONS CONSERVEES DES GENES D'ADN-POLYMERASES ARN-DEPENDANTES, SUR UNE PREPARATION D'AGENT INFECTANT PURIFIE A PARTIR DE CULTURE
10 **DE CELLULES DE LA LIGNEE LM7**

L'approche moléculaire a consisté à utiliser une technique PCR (8) qui permet d'amplifier une région relativement conservée du gène *pol* des rétrovirus exogènes et endogènes, mais aussi des virus codant pour une enzyme
15 à activité transcriptase inverse (RT) tels que notamment le virus de l'hépatite B et, implicitement, de tout gène d'ADN polymérase ARN dépendante ou d'enzyme, présentant des homologies de séquences suffisantes dans les régions définies par les amorces d'amplification utilisées. Cette
20 technique PCR a été utilisée sur les acides nucléiques extraits d'une préparation d'agent infectant purifiée, obtenue selon le protocole (14) à partir des surnageants de la culture LM7 d'origine (7) gardés congelés à -80°C depuis lors. Les fractions contenant le pic d'activité RT
25 de type LM7 sont reprises dans un volume d'un tampon contenant du thiocyanate de guanidine (15) et sont stockées à -80°C jusqu'à extraction des acides nucléiques selon la technique décrite par P.Chomzynski (15).

Préalablement à la réaction PCR, l'ARN de
30 l'échantillon a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc) avec des amorces dites "random" (hexanucléotides en mélange) à l'aide du Kit "cDNA synthesis system plus" (Amersham), selon les instructions du fabricant et en se basant sur une valeur approximée à un log près de la
35 quantité d'ARN présente dans l'échantillon.

L'ADN obtenu après amplification PCR de l'ADNc, a

été inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning® (British Biotechnology). Les 2 µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1 µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION 5 BUFFER", 2 µl de "pCR™ VECTOR" (25 ng/ml) et 1 µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément au instructions du kit TA Cloning®. A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes ont été 10 repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (16). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les 15 plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du "TA cloning 20 kit". La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé 25 avec l'appareil "Automatic Sequencer", modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Les séquences obtenues ont ensuite été analysées à l'aide des logiciels Mac Vector® et Geneworks® sur banque de données informatiques Genbank®, pour les séquences 30 nucléiques, et Swiss Prot®, pour les séquences en acides aminés déduites des trames de lecture mises en évidence dans les séquences nucléiques. L'analyse des séquences obtenues à partir de l'échantillon viral provenant des surnageants LM7 décongelés, et purifié au pic d'activité 35 transcriptase inverse sur gradient de saccharose, a mis en évidence une population majoritaire de clones (environ 42%

des clones), relativement à la représentativité individuelle des autres séquences (toujours inférieure à 5%, voire 10% pour un petit nombre), et présentant des homologues partielles avec des rétrovirus connus dans la région "pol" attendue. Ce clone est dénommé MSRV2-A et identifié par SEQ ID N010 (Cf. Fig. 1). La région amplifiée entre les amorces PCR est homologue à la séquence correspondante MSRV2-B identifiée par SEQ ID N011 (Cf. Fig. 5), décrite dans l'exemple 2. Les différences observées dans les séquences situées au niveau des amorces PCR s'expliquent par l'utilisation d'amorces dégénérées en mélange, utilisées dans des conditions techniques différentes. L'interrogation de la banque de données Genbank® actualisée à ce jour n'a pas permis de mettre en évidence une séquence identique ou présentant des homologues significatives.

Cette séquence est présentée dans la figure 1. La séquence présentée à la figure 1 possède un cadre de lecture ouvert en phase avec les deux amorces PCR retrouvées aux extrémités, mais elle est plus courte que l'ensemble des séquences rétrovirales connues dans la région attendue entre ces amorces. Une délétion de 45 paires de bases (15 acides aminés) y est observée, relativement aux séquences rétrovirales correspondantes (8), à la suite de la séquence de l'amorce amont alors que les séquences précédant l'amorce aval sont présentes. Cependant la trame de lecture est ouverte et ininterrompue sur toute la séquence incluant les amorces et la séquence en acides aminés déduite présente une homologie significative avec la région correspondante des rétrovirus connus. Dans la séquence interne aux amorces PCR, les acides aminés Glu, Arg, Gln, Pro et Asp, normalement assez bien conservés dans cette région pol des rétrovirus et des virus avec activité transcriptase inverse connus (8) sont retrouvés conservés aux bonnes positions dans la trame de lecture de la séquence originale.

Enfin, étant donné que cette séquence est suffisamment divergente des séquences rétrovirales déjà décrites dans les banques de données, on peut avancer qu'il s'agit d'une séquence appartenant à un nouvel agent infectant et/ou pathogène, dénommé MSRV-2A. Cet agent s'apparente à priori, d'après l'analyse des séquences obtenues, à un rétrovirus, mais, étant donnée la technique utilisée pour obtenir cette séquence, il peut aussi s'agir d'un virus à ADN dont le génome code pour une enzyme qui possède accessoirement une activité transcriptase inverse comme c'est le cas, par exemple, pour le virus de l'hépatite B, HBV (8). De plus, le caractère aléatoire des amorces dégénérées utilisées pour cette technique d'amplification PCR peut très bien avoir permis, du fait d'homologies de séquences imprévues ou de sites conservés dans le gène d'une enzyme apparentée, l'amplification d'un acide nucléique provenant d'un agent pathogène et/ou co-infectant procaryote ou eucaryote (protiste).

EXEMPLE 2: OBTENTION DE CLONES DENOMMES MSRV-1B ET MSRV-2B, DEFINISSANT RESPECTIVEMENT UN RETROVIRUS MSRV-1 ET UN AGENT CO-INFECTANT MSRV2, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS, SUR DES PREPARATIONS DE VIRIONS ISSUES DES LIGNEES LM7PC ET PLI-2

Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Shih (8) a été utilisée. Cette technique permet, par traitement de tous les composants du milieu réactionnel par la DNase, d'éliminer toute trace d'ADN contaminant. Elle permet parallèlement, par l'utilisation d'amorces différentes mais chevauchantes dans deux séries successives de cycles d'amplifications PCR, d'augmenter les chances d'amplifier un ADNc synthétisé à partir d'une quantité d'ARN faible au départ et encore réduite dans l'échantillon par l'action parasite de la DNase sur l'ARN. En effet, la DNase est utilisée dans des conditions

d'activité en excès qui permettent d'éliminer toute trace d'ADN contaminant avant inactivation de cette enzyme restant dans l'échantillon par chauffage à 85°C pendant 10 minutes. Cette variante de la technique PCR décrite par Shih (8), a été utilisée sur un ADNc synthétisé à partir des acides nucléiques de fractions de particules infectantes purifiées sur gradient de saccharose selon la technique décrite par H. Perron (14) à partir de l'isolat "POL-2" (ECACC n°V92072202) produit par la lignée PLI-2 (ECACC n°92072201) d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG (ECACC n°V93010816) produit par la lignée LM7PC (ECACC n°93010817) d'autre part. Ces cultures ont été obtenues selon les méthodes ayant fait l'objet des demandes de brevet publiées sous les n° WO 93/20188 et WO 93/20189.

Après clonage avec le TA Cloning Kit® des produits amplifiés par cette technique et analyse de la séquence à l'aide du séquenceur automatique selon ce qui est décrit dans l'exemple 1, les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel Geneworks®, sur la dernière version disponible de la banque de données Genbank®.

Les séquences clonées et séquencées à partir de ces échantillons correspondent notamment à deux types de séquences: un premier type de séquence, retrouvé dans la majorité des clones (55% des clones issus des isolats POL-2 des culture PLI-2, et, 67% des clones issus des isolats MS7PG des cultures LM7PC) qui correspond à une famille de séquences "pol" proches mais différentes du rétrovirus endogène humain dénommé ERV-9 ou HSERV-9, et un second type de séquence qui correspond à des séquences très fortement homologues à la séquence attribuée à un agent infectant et/ou pathogène dénommé précédemment MSRV-2.

Le premier type de séquences représentant la majorité des clones est constituée de séquences dont la variabilité permet de définir quatre sous-familles de séquences. Ces sous-familles sont suffisamment proches

entre elles pour qu'on puisse les considérer comme des quasi-espèces provenant d'un même rétrovirus, tel que cela est bien connu pour le rétrovirus HIV-1 (17), ou comme le résultat de l'interférence avec plusieurs provirus endogènes co-régulés dans les cellules productrices. Ces éléments endogènes plus ou moins défectifs sont sensibles aux mêmes signaux de régulation générés éventuellement par un provirus répliatif, puisqu'ils appartiennent à la même famille de rétrovirus endogènes (18). Cette nouvelle famille de rétrovirus endogènes ou, alternativement, cette nouvelle espèce rétrovirale dont on a obtenu en culture la génération de quasi-espèces, et qui contient un consensus des séquences décrites ci-dessous est dénommée MSRV-1B.

Dans la figure 2 sont présentées les consensus généraux des séquences des différents clones MSRV-1B séquencés lors de cette expérience, ces séquences étant respectivement identifiées par SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, et SEQ ID N06. Ces séquences présentent une homologie en acides nucléiques allant de 70% à 88% avec la séquence HSERV9 référencée X57147 et M37638 dans la base de données Genbank®. L'arbre phylogénétique de ces séquences est présenté dans la figure 3. Dans cette figure, les sous-familles A, B, C, D représentent les séquences qui ont été retrouvées de manière prépondérante dans des expériences similaires répétées ultérieurement, dans les échantillons d'ARN pur de virions purifiés à partir des isolats MS7PG et POL-2. A partir de ces familles de séquences, quatre séquences nucléiques "consensus" représentatives de différentes quasi-espèces d'un rétrovirus MSRV-1B éventuellement exogène, ou de différentes sous-familles d'un rétrovirus endogène MSRV-1B, ont été définies. Ces consensus représentatifs sont présentés dans la figure 4, avec la traduction en acides aminés. Une trame de lecture fonctionnelle existe pour chaque sous-famille de ces séquences MSRV-1B, et l'on peut voir que la trame de lecture ouverte fonctionnelle

correspond à chaque fois à la séquence en acides aminés venant en deuxième ligne sous la séquence en acide nucléiques. Le consensus général de la séquence MSRV-1B, identifié par SEQ ID N07 et obtenu par cette technique PCR
5 dans la région "pol" est présenté dans la figure 2.

Le deuxième type de séquence représentant la majorité des clones séquencés est représenté par la séquence MSRV-2B présentée dans la figure 5 et identifiée par SEQ ID N011. La région amplifiée entre les amorces PCR
10 est homologue à une base près à la séquence MSRV2-A (SEQ ID N010 selon Fig.1) interne aux amorces PCR décrite dans l'Exemple 1. Les différences observées dans les séquences correspondant aux amorces PCR s'expliquent par l'utilisation d'amorces dégénérées en mélange utilisées
15 dans des conditions techniques différentes.

Les séquences MSRV-2A (SEQ ID N010) et MSRV-2B (SEQ ID N011) sont à l'évidence homologues, voire identiques, issues du même organisme et suffisamment divergentes des séquences rétrovirales déjà décrites dans
20 les banques de données pour qu'on puisse avancer qu'il s'agit d'une région de séquence appartenant à un nouvel agent infectant, dénommé MSRV-2. Cet agent infectant s'apparenterait à priori, d'après l'analyse des premières séquences obtenues, à un rétrovirus, mais, étant donnée la
25 technique utilisée pour obtenir cette séquence, il pourrait aussi s'agir d'un virus à ADN dont le génome code pour une enzyme qui possède accessoirement une activité transcriptase inverse comme c'est le cas, par exemple, pour le virus de l'hépatite B, HBV (8). De plus, le
30 caractère aléatoire des amorces dégénérées utilisées pour cette technique d'amplification PCR peut très bien avoir permis, du fait d'homologies de séquences imprévues ou de sites conservés dans le gène d'une enzyme apparentée, l'amplification d'un acide nucléique provenant d'un agent
35 pathogène et/ou co-infectant prokaryote ou eukaryote (protiste).

EXEMPLE 3: OBTENTION D'UN CLONE PSJ17, DEFINISSANT UN RETROVIRUS MSRV-1, PAR REACTION DE TRANSCRIPTASE INVERSE ENDOGENE SUR UNE PREPARATION DE VIRION ISSUE DE LA
5 **LIGNEE PLI-2.**

Cette approche vise à obtenir des séquences d'ADN rétrotranscrites à partir de l'ARN supposé rétroviral dans l'isolat, en utilisant l'activité transcriptase inverse présente dans ce même isolat. Cette activité transcriptase
10 inverse ne peut théoriquement fonctionner qu'en présence d'un ARN rétroviral, lié à un ARNt amorce ou hybridé à des brins courts d'ADN déjà rétro-transcrits dans les particules rétrovirales (19). Ainsi l'obtention de séquences rétrovirales spécifiques dans un matériel
15 contaminé par des acides nucléiques cellulaires, a été optimisée selon ces auteurs grâce à l'amplification enzymatique spécifique des portions d'ARN viraux par une activité transcriptase inverse virale. Les auteurs ont pour cela, déterminé les conditions physico-chimiques
20 particulières dans lesquelles cette activité enzymatique de transcription inverse sur des ARN contenus dans des virions pouvait être effective in vitro. Ces conditions correspondent à la description technique des protocoles présentés ci-dessous (réaction de RT endogène,
25 purification, clonage et séquençage).

L'approche moléculaire a consisté à utiliser une préparation de virion concentré, mais non purifié, obtenu à partir des surnageants de culture de la lignée PLI-2 préparés selon la méthode suivante : les surnageants de
30 culture sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 trs/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite, congelés à -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur
35 un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 trs/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T)

pendant 2 h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virion concentré, mais non purifié. Cet échantillon viral concentré mais non purifié

5 a été utilisé pour effectuer une réaction dite de transcription inverse endogène, telle que décrite ci-après : un volume de 200 µl de virion purifié selon le protocole décrit ci-dessus et contenant une activité transcriptase inverse d'environ 1-5 millions de dpm est décongelé à 37°C

10 jusqu'à apparition d'une phase liquide, puis placé sur de la glace. Un tampon 5 fois concentré a été préparé avec les composants suivants: Tris-HCl pH 8,2, 500 mM; NaCl 75 mM; MgCl₂ 25 mM; DTT 75 mM et NP 40 0,10 %. 100 µl de tampon 5X + 25 µl d'une solution de dATP 100 mM + 25 µl

15 d'une solution de dTTP 100 mM + 25 µl d'une solution de dGTP 100 mM + 25 µl d'une solution de dCTP 100 mM + 100-µl d'eau distillée stérile + 200 µl de la suspension de virions (activité T.I. de 5 millions de DPM) dans le PBS ont été mélangés et incubés à 42°C pendant 3 heures. Après

20 cette incubation le mélange réactionnel est directement ajouté à un mélange tamponné phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Sigma ref. P 3803); la phase aqueuse est collectée et un volume d'eau distillée stérile est ajouté à la phase organique pour ré-extraire le matériel

25 nucléique résiduel. Les phases aqueuses collectées sont regroupées et les acides nucléiques contenus sont précipités par addition d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 au 1/10 de volume + 2 volumes d'éthanol + 1 µl de glycogène (Boehringer-Mannheim ref. 901 393) et mise à -20°C de

30 l'échantillon pendant 4 h ou la nuit à +4°C. Le précipité obtenu après centrifugation est ensuite lavé avec de l'éthanol à 70% et resuspendu dans 60 ml d'eau distillée. Les produits de cette réaction ont ensuite été purifiés, clonés et séquencés selon les protocole décrit ci-après:

35 des ADN bouts francs avec des adénines non-appariées aux extrémités ont été générés: une réaction de "remplissage"

a d'abord été effectuée: 25 μ l de la solution d'ADN précédemment purifiée ont été mélangés avec 2 μ l d'une solution 2,5 mM contenant, en quantité équimolaire, dATP + dGTP + dTTP + dCTP / 1 μ l d'ADN polymérase T4 (Boehringer-Mannheim ref. 1004 786) / 5 μ l de 10X "incubation buffer for restriction enzyme" (Boehringer-Mannheim ref. 1417 975) / 1 μ l d'une solution à 1% de sérum-albumine bovine / 16 μ l d'eau distillée stérile. Ce mélange a été incubé 20 minutes à 11°C. 50 μ l de tampon TE et 1 μ l de glycogène (Boehringer-Mannheim ref. 901 393) y ont été ajoutés avant extraction des acides nucléiques avec du phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Sigma ref. P 3803), et précipitation à l'acétate de sodium comme décrit précédemment. L'ADN précipité après centrifugation est resuspendu dans 10 μ l de tampon 10 mM Tris pH 7,5. Puis, 5 μ l de cette suspension ont été mélangés avec 20 μ l de tampon Taq 5X, 20 μ l de 5mM dATP, 1 μ l (5U) de Taq ADN polymérase (AmplitaqTM) et 54 μ l d'eau distillée stérile. Ce mélange est incubé 2 h à 75°C avec un film d'huile à la surface de la solution. L'ADN en suspension dans la solution aqueuse prélevée en dessous du film d'huile après incubation est précipité comme décrit précédemment et resuspendu dans 2 μ l d'eau distillée stérile. L'ADN obtenu a été inséré dans un plamide à l'aide du kit TA CloningTM. Les 2 μ l de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 μ l d'eau distillée stérile, 1 μ l d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2 μ l de "pCRTM VECTOR" (25 ng/ml) et 1 μ l de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions du kit TA Cloning[®] (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (16). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de

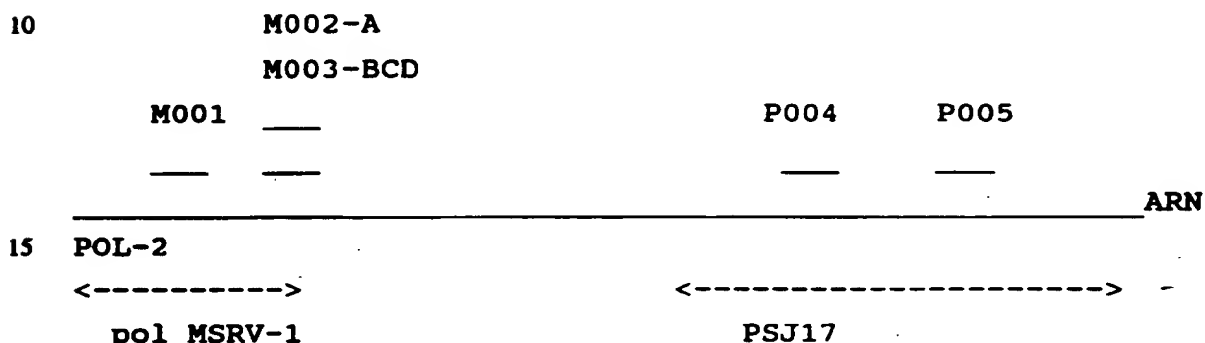
restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après
5 hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning Kit®. La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye
10 deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "Automatic Sequencer, modèle 373 A" Applied Biosystems, selon les instructions du fabricant.

L'analyse discriminante sur les banques de données
15 informatiques des séquences clonées à partir des fragments d'ADN présents dans le mélange réactionnel a permis de mettre en évidence une séquence de type rétroviral. Le clone correspondant PSJ17 a été entièrement séquencé et la séquence obtenue, présentée dans la figure 8 et identifiée
20 apr SEQ ID N09, a été analysée à l'aide du logiciel "Geneworks®" sur les banques de données actualisées "Genebank®". L'analyse des banques de données n'a pas permis de trouver de séquence identique déjà décrite. Seule une homologie partielle a pu être retrouvée avec
25 certains éléments rétroviraux connus. L'homologie relative la plus intéressante concerne un rétrovirus endogène dénommé ERV-9, ou HSERV-9, selon les références (20).

EXEMPLE 4: AMPLIFICATION PCR DE LA SEQUENCE
30 **NUCLEIQUE CONTENUE ENTRE LA REGION 5' DEFINIE PAR LE CLONE "POL MSRV-1B" ET LA REGION 3' DEFINIE PAR LE CLONE PSJ17.**

Cinq oligonucléotides, M001, M002-A, M003-BCD, P004 et P005, ont été définis pour amplifier de l'ARN provenant de virions purifiés POL-2. Des réactions de
35 contrôle ont été effectuées de manière à contrôler la présence de contaminants (réaction sur de l'eau).

L'amplification consiste en une étape de RT-PCR selon le protocole décrit dans l'Exemple 2, suivie d'une PCR "nichée" selon le protocole PCR décrit dans le document EP-A-0569272. Dans le premier cycle RT-PCR, les amorces M001 et P004 ou P005 sont utilisées. Dans le deuxième cycle PCR, les amorces M002-A ou M003-BCD, et l'amorce P004 sont utilisées. Les amorces sont positionnées comme suit:



Leur composition est:

amorce M001: GGTCITICCAIGG (SEQ ID N020)
 20 amorce M002-A: TTAGGGATAGCCCTCATCTCT (SEQ ID N021)
 amorce M003-BCD: TCAGGGATAGCCCCCATCTAT (SEQ ID N022)
 amorce P004: AACCCCTTGCCACTACATCAATTT (SEQ ID N023)
 amorce P005: GCGTAAGGACTCCTAGAGCTATT (SEQ ID N024)

Le produit d'amplification "nichée" obtenu et
 25 dénommé M003-P004 est présenté dans la figure 7, et
 correspond à la séquence SEQ ID N08.

**EXEMPLE 5: AMPLIFICATION ET CLONAGE D'UNE PORTION
 DU GENOME RETROVIRAL MSRV-1 A L'AIDE D'UNE SEQUENCE DEJA
 30 IDENTIFIEE, DANS UN ECHANTILLON DE VIRUS PURIFIE AU PIC
 D'ACTIVITE TRANSCRIPTASE INVERSE**

Une technique PCR dérivée de la technique publiée
 par Frohman (21) a été utilisée. La technique dérivée
 permet, à l'aide d'une amorce spécifique en 3' du génome à
 35 amplifier, d'élonguer la séquence vers la région 5' du
 génome à analyser. Cette variante technique est décrite

dans la documentation de la firme "Clontech Laboratories Inc., (Palo-Alto California, USA) fournie avec son produit "5'-AmpliFINDER™ RACE Kit", qui a été utilisé sur une fraction de virion purifié comme décrit précédemment.

5 Les amorces 3' spécifiques utilisées dans le protocole du kit pour la synthèse du cDNA et l'amplification PCR sont respectivement complémentaires aux séquences MSRV-1 suivantes:

cDNA : TCATCCATGTACCGAAGG (SEQ ID N025)
10 amplification : ATGGGGTTCCCAAGTTCCCT (SEQ ID N026)

Les produits issus de la PCR ont été purifiés après purification sur gel d'agarose selon les méthodes conventionnelles (16), puis resuspendus dans 10 ml d'eau
15 distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à l'extrémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement inséré dans un plamide à l'aide du kit TA Cloning™ (British Biotechnology). Les 2 µl de solution d'ADN ont
20 été mélangés avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1 µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2 µl de "pCR™ VECTOR" (25 ng/ml) et 1 µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux
25 instructions du kit TA Cloning® (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (16). La
30 préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le
35 séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de

clonage du TA Cloning Kit®. La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "automatic sequencer, modèle 373 A" Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Cette technique a d'abord été appliquée à deux fractions de virion purifié comme décrit ci-après, sur saccharose à partir de l'isolat "POL-2" produit par la lignée PLI-2 d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG produit par la lignée LM7PC d'autre part: les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 trs/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite, congelés à -80°C ou utilisés tels quels pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 trs/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2 h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient de sucrose dans un tampon PBS stérile (15 à 50% poids/poids) et ultracentrifugé à 35 000 trs/min (100 000g) pendant 12 h à +4°C dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies et 20 µl sont prélevés dans chaque fraction après homogénéisation pour y doser l'activité transcriptase inverse selon la technique décrite par H. Perron (7). Les fractions contenant le pic d'activité RT "de type LM7" sont ensuite diluées dans du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 35 000 trs/min (100 000g) pour sédimenter les particules virales. Le culot de virion purifié ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour

l'extraction d'ARN. La réaction de synthèse de cDNA mentionnée plus haut est réalisée sur cet ARN extrait de virion extracellulaire purifié. L'amplification PCR selon la technique citée plus-haut a permis d'obtenir le clone
5 F1-11 dont la séquence identifiée par SEQ ID N02, est présentée dans la figure 8.

Ce clone permet de définir, avec les différents clones préalablement séquencés, une région représentative du gène "pol" du rétrovirus MSRV-1, telle que présentée
10 dans la figure 9. Cette séquence dénommée SEQ ID N01 est reconstituée à partir de différents clones se recouvrant à leurs extrémités, en corrigeant les artéfacts liés aux amorces et aux techniques d'amplification ou de clonage, qui interrompraient artificiellement la trame de lecture
15 de l'ensemble.

Dans la figure 9, la trame de lecture potentielle avec sa traduction en acides aminés est présentée en dessous de la séquence en acides nucléiques.

20 **EXEMPLE 6: CAPTURE, AMPLIFICATION ET CLONAGE D'UNE PORTION DU GENOME MSRV-2 A L'AIDE D'UNE SEQUENCE DEJA IDENTIFIEE, DANS UNE CULTURE INFECTEE PAR MSRV-2**

Les surnageants d'une culture cellulaire exprimant une activité transcriptase inverse "de type LM7" similaire
25 à celle décrite par H. Perron (7) ont été collectés régulièrement pendant plusieurs semaines et conservés congelés à -80°C après addition de 10% de glycérol. L'ensemble des surnageants a ensuite été décongelé afin de concentrer les particules infectantes par
30 ultracentrifugation et de les purifier par centrifugation à l'équilibre sur gradient de saccharose; l'activité transcriptase inverse a ensuite été mesurée dans les différentes fractions collectées sur le gradient selon la méthodologie décrite par H. Perron (14).

35 Les différentes fractions représentant le pic d'activité transcriptase inverse ont été regroupées afin

d'en extraire les acides nucléiques selon un protocole destiné à la purification d'ARN (15), mais les acides nucléiques extraits n'ont pas été traités par la DNase. Une amplification PCR dérivée de la technique décrite par Shih (8) a été effectuée directement sur cet échantillon d'acides nucléiques non traité par la DNase, selon un procédé d'amplification d'ARN tel que décrit dans le document EP-A-0 569 272, dans un volume total de 100 μ l, contenant 200 ng d'ARN, 1 μ l d'ARN Guard, 33 μ moles de chaque mélange d'amorces (MOP) décrits par Shih (8), et identiques à ceux utilisés pour la PCR (ADN) directe ; 0,25 mM de chaque dNTP, 10 μ l de tampon 10X, 2,5 u d'enzyme Taq et 0,4 μ l d'enzyme RT (RT-AMV; 10u) sont aussi ajoutés aux échantillons. Les cycles d'amplification sont réalisés comme suit: dénaturation de l'ARN 65°C/10 minutes, synthèse de l'ADNc 50°C/8 minutes, puis les cycles sont identiques à ceux de la PCR décrite par Shih (8). Des réactions de contrôle ont été effectuées de manière à contrôler l'absence de contaminants (réaction sur de l'eau). Les produits ont été analysés sur gel d'acrylamide 10%.

Les échantillons amplifiés par RT-PCR ont ensuite été clonés et séquencés selon les techniques décrites dans l'exemple 1.

La majorité des clones séquencés à partir du produit de RT-PCR correspond à la séquence MSRV-2A et à son équivalente MSRV-2B précédemment décrites dans les exemples 1 et 2.

Par ailleurs, après élimination des séquences artéfactuelles, il s'avère que les autres clones séquencés correspondent à des séquences de type MSRV-1 telles que décrites dans les exemples 1 et 2.

Après la vérification des séquences présentes dans ce matériel nucléaire provenant de ces fractions purifiées contenant des particules infectantes dont au moins une partie est associée à une activité transcriptase inverse,

le matériel nucléique restant a été utilisé pour effectuer une capture spécifique des acides nucléiques portant la séquence MSRV2 préalablement identifiée et décrite dans les exemples 1 et 2.

5 Dans une étape préalable, le matériel génétique portant la séquence MSRV2 a été amplifié par une technique PCR monodirectionnelle de 50 cycles à l'aide d'une seule amorce. Cette amorce est couplée à une molécule de biotine à son extrémité 3', permet l'amplification
10 monodirectionnelle de 3' vers 5' et correspond à la séquence suivante identifiée sous SEQ ID N038 :

5' TAAAGATCTAGAATTCGGCTATAGGCGGCATCCGGCAACT 3'

Ensuite, la capture a été effectuée en solution avec des billes magnétiques couplées à l'avidine
15 (Dynabeads®) selon les instructions du fabricant (Dyna1) et, après une série de lavages à température ambiante permettant d'éliminer les acides nucléiques non couplés à une biotine, une PCR a été effectuée directement sur ces billes lavées avec une amorce spécifique en 3' et une
20 amorce en 5' apportée par une solution d'oligonucléotide de 10 bases (10 mer) avec une séquence aléatoire.

L'amorce d'amplification spécifique orientée de 3' vers 5' correspond à la séquence identifiée par SEQ ID N013:

25 5' GCATCCGGCAACTGCACG 3'

La PCR effectuée à 35°C sur 40 cycles avec ces amorces a permis d'amplifier le matériel génétique spécifiquement biotinilé par la première étape de PCR et capturé sur les billes Dynabeads®. Après clonage avec le
30 kit "TA cloning" de l'ADN amplifié par cette seconde étape de PCR et séquençage des clones recombinants, selon les techniques décrites dans l'Exemple 1, une séquence de 748 paires de bases a été obtenue. Cette séquence d'acides nucléiques SEQ ID N012 est présentée dans la figure 10.
35 Cette séquence élonguée sera dénommée ensuite MSRV-2EL1.

La séquence inverse complémentaire de l'amorce

SEQ ID N013 est présente à l'extrémité 3' et est encadrée sur la figure 10. En amont de cette amorce, on retrouve la séquence déjà identifiée dans les clones MSRV-2A et MSRV-2B.

5 La traduction en acide aminés de cette séquence selon les 6 trames de lectures possibles est présentée dans la figure 11.

 Un alignement de la séquence MSRV2-A (SEQ ID N010) sur la séquence MSRV-2EL1 (SEQ ID N012) est présenté dans
10 la figure 12. On note que la séquence MSRV-2A est rigoureusement identique à la séquence élonguée, hormis quelques différences dans la région correspondant aux amorces dégénérées utilisées pour obtenir MSRV-2A. Cette région est soulignée dans cette figure ; par ailleurs, la
15 région d'hybridation de l'amorce SEQ ID N013, (hormis la queue de clonage) est encadrée, celle de l'amorce SEQ ID N014 est présentée entre crochets. La séquence réelle du génome MSRV-2 dans cette région est vraisemblablement celle de MSRV-2EL1, où elle n'a pas été
20 imposée par des amorces hybridées à basse stringence comme c'est le cas pour MSRV-2A (et MSRV-2B de même).

 La séquence MSRV-2EL1 correspond donc à une nouvelle région séquencée du génome MSRV-2. Ceci a été vérifié à l'aide de nouvelles amorces PCR définies dans
25 MSRV-2EL1 et MSRV-2A qui ont permis une amplification spécifique sur les acides nucléiques utilisés pour le clonage décrit dans cet exemple.

 Le résultat d'interrogation de la banque de donnée Genbank®, actualisée en août 1994, avec la séquence MSRV-
30 2EL1 ne montre aucune homologie significative avec des séquences génétiques connues à ce jour. Cependant, l'interrogation des traductions possibles en acides aminés selon les 6 trames de lecture potentielles de cette séquence MSRV-2EL1, montre des homologies partielles avec
35 des séquences bactériennes, virales ou cellulaires.

 L'absence d'amplification PCR avec des amorces

spécifiques sur de l'ADN humain normal montre qu'il ne s'agit pas d'une séquence d'origine cellulaire. MSRV-2 est donc un agent infectant exogène à l'homme. Cependant, la nature dégénérée des mélanges d'amorces, utilisées selon
5 des variantes de la technique décrite par Shih (8), qui ont permis l'identification des premiers éléments de séquence dénommés MSRV-2A et MSRV-2B, peut avoir permis l'amplification imprévue d'un génome n'appartenant pas à un rétrovirus, ni même à un gène codant pour une ADN-
10 polymérase ARN-dépendante.

EXEMPLE 7 : CULTURE DE CELLULES DE LIQUIDES ARTICULAIRES DE PATIENTS ATTEINTS DE POLYARTHRITE RHUMATOÏDE (PR) ET DETECTION D'UNE ACTIVITE TRANSCRIPTASE
15 **SIMILAIRE A CELLE QUE PRODUIT LA CULTURE LM7.**

Du liquide articulaire (LA) a été prélevé stérilement dans une articulation du genou présentant une atteinte inflammatoire, chez une patiente atteinte de polyarthrite rhumatoïde. Ce liquide a été centrifugé à
20 +4°C, à 1800 trs/min pendant 10 minutes. Une fois le surnageant prélevé et aliquoté à -80°C, le culot cellulaire a été repris dans du milieu de culture RPMI dont la composition est la suivante: milieu RPMI 1640 additionné de pénicilline (200 000 U/L), de streptomycine
25 (200 mg/L), de L-glutamine (6 mM/l), de pyruvate (1%), d'acides aminés non-essentiels (1%), éventuellement d'un anticorps polyclonal anti-interféron bêta humain (10 U/ml), et de 20% de sérum de veau foetal décomplémenté par incubation à 56°C pendant 30 minutes. Ces cellules en
30 suspension ont été transférées dans un petit flacon de culture (25 cm²) et le volume complété à 5 ml avec le milieu sus-décrit dans lequel les cellules ont été maintenues en culture in vitro dans une étuve à 5% de CO₂ à 37°C.

35 Après 4 jours, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais de même composition et le milieu

prélevé, centrifugé à 1800 trs/min pendant 10 minutes. Le surnageant est aliquoté et stocké à -80°C ; le culot constitué de cellules qui n'avaient pas adhéré au flacon de culture est repris dans du milieu de culture et
5 transféré dans un autre flacon. Ces cellules seront maintenues en culture comme des cellules en suspension.

Les milieux de culture sont toujours changés au moins deux fois par semaine.

Après trois semaines de culture, le flacon dans
10 lequel a été effectué le premier passage de cellules du liquide articulaire pathologique, contient des cellules adhérentes de type macrophagique et d'autres, de type fibroblastique, qui présentent une prolifération par "plages" de mitoses. Ces plages de prolifération ont
15 progressivement recouvert la surface inférieure du flacon de culture et, au stade de confluence, ces cellules fibroblastiques ont été décollées par grattage et réparties dans deux flacons de 25 cm² avec 5 ml de milieu de culture. Ces cellules adhérentes ont été ainsi passées
20 et dédoublées tant que le potentiel de prolifération le permettait. En effet, après le sixième passage, soit environ deux mois de culture, les cellules fibroblastiques ont cessé de proliférer et les flacons ont été conservés jusqu'à dégénérescence des cellules.

25 Dans les flacons qui ont servi à passer les cellules en suspension, principalement des cellules de type lymphoïde, des cellules adhérentes de type macrophagique ou de type fibroblastique ont parfois adhéré tardivement. Les cellules lymphoïdes en suspension ont
30 dégénéré sans donner lieu à une prolifération et n'ont pas été maintenues en culture après trois semaines.

L'ensemble des surnageants de culture de tous ces flacons a été stocké aliquoté à -80°C.

La recherche d'un éventuel agent rétroviral
35 produit par les cellules de ce liquide articulaire pathologique d'une patiente atteinte de PR a d'abord

consisté à rechercher une activité transcriptase inverse selon différentes conditions physico-chimiques permettant une détection non sélective d'une telle enzyme codée par un rétrovirus non connu à l'avance, ainsi que cela fut
5 fait par H. Perron et coll., pour la recherche d'une activité transcriptase inverse dans des surnageants de culture de cellules du système nerveux de sclérose en plaques (7). Les conditions de détection d'un signal spécifique d'une activité transcriptase inverse dans les
10 surnageants de culture de cellules du LA de ce cas de polyarthrite rhumatoïde (PR) se sont alors révélées très proches de celles qui constituent l'optimum pour la détection du rétrovirus produit par la culture LM7 provenant d'un cas de sclérose en plaques (SEP). On a donc
15 cherché à vérifier si cette activité pouvait être détectée dans les mêmes conditions que pour le rétrovirus MSRV1/LM7 isolé dans la SEP, après réalisation d'une sédimentation à l'équilibre sur gradient de saccharose, d'un concentrat de particules provenant des surnageants de cultures du LA de
20 PR.

Une série de surnageants de culture des cellules adhérentes du LA de ce cas de PR a été décongelée afin de disposer d'un volume total d'au moins 100 ml. Ces surnageants ont été mélangés, pré-centrifugés afin
25 d'éliminer les débris cellulaires, ultracentrifugés afin de sédimenter d'éventuelles particules rétrovirales et le culot ainsi sédimenté a été déposé sur un gradient de saccharose qui a été centrifugé à 100 000 g afin d'obtenir une séparation des éléments présents dans le culot
30 d'ultracentrifugation et de doser, après recueil de fractions d'un volume égal et de densité de saccharose croissante, l'activité transcriptase inverse dans chacune de ces fractions. L'ensemble de ces opérations a été effectué dans les conditions décrites par H. Perron (14).

35 Le résultat du dosage d'une activité transcriptase inverse avec les conditions optimisées pour la souche LM7,

dans les fraction du gradient "PR" est présenté dans la figure 13. On peut voir qu'une activité transcriptase inverse significative (supérieure au cut-off de 2000 DPM) est retrouvée dans les fractions 2 à 5, ainsi que dans la fraction 9. L'activité retrouvée dans les fractions les moins denses est mal focalisée ce qui est probablement dû à un excès de matériel déposé sur le gradient (tube de 5 ml). Le pic secondaire dans la fraction plus dense (n°9) est vraisemblablement constitué de virions plus denses ayant perdu leur enveloppe (capsides) ainsi que cela a déjà été observé dans les gradients réalisés avec des virions produits par la lignée LM7 (14).

A ce stade des travaux effectués sur les cultures de cellules de LA provenant de PR, il semble que celles-ci produisent des particules possédant une transcriptase inverse du même type que celle qui est détectée dans les virions produits par les cellules LM7 de leptoméninges de SEP.

EXEMPLE 8: CULTURE DE CELLULES LYMPHOBLASTOÏDES B DE PATIENTS ATTEINTS DE POLYARTHRITE RHUMATOÏDE (PR).

Selon un protocole bien connu de l'homme de métier, des lignées lymphoblastoïdes, immortalisées par adjonction in vitro de la souche B95 du virus d'Epstein-Barr (EBV) ou par la souche autologue hébergée par les lymphocytes B du patient, ont été établies à partir des lymphocytes B du sang périphérique de patients atteints de PR.

Brièvement, les cellules mononuclées du sang ont été séparées par centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque® (Flow/ICN), lavées par centrifugation dans du RPMI 1640, puis reprises dans un milieu contenant du RPMI 1640 additionné de pénicilline (200 000 U/L), de streptomycine (200 mg/L), de L-glutamine (2 mM/l), de pyruvate (1%), d'acides aminés non-essentiels (1%), de tampon HEPES (1%) et de 20% de sérum de veau foetal

décomplémenté par incubation à 56°C pendant 30 minutes. Ces cellules en suspension sont transférées dans un petit flacon de culture (25 cm²) et le volume est complété à 5 ml avec le milieu sus-décrit dans lequel les cellules
5 seront maintenues en culture in vitro dans une étuve à 5% de CO₂ à 37°C.

Les milieux sont renouvelés par moitié deux fois par semaine: après décantation pendant au moins 2 h des flacons placés verticalement, la moitié du milieu
10 surnageant est prélevé (et conservé congelé à -80°C, dès qu'une lignée est établie) et remplacé par du milieu frais dans lequel sont émulsionnés les lymphocytes sédimentés. Quand une lignée est établie et la densité cellulaire suffisante dans un flacon, les cellules ainsi émulsionnées
15 à la pipette sont réparties dans deux flacons et la culture ainsi dédoublée.

Les cellules lymphoïdes, après séparation sur Ficoll, sont mises en présence de cyclosporine A pendant 10 à 20 jours, afin de permettre l'inhibition et
20 l'élimination des lymphocytes T de la culture. En effet, ceux-ci ont la capacité de bloquer l'immortalisation de lymphocytes B présents dans la culture par le virus EBV.

Selon les cas, la culture est maintenue telle que après traitement à la cyclosporine A, afin d'attendre la
25 survenue éventuelle d'une immortalisation de lymphocyte B par la souche EBV hébergée par le patient lui-même (s'il est séropositif pour ce virus), ou bien 1 ml de surnageant de la lignée B95 productrice de virions EBV, après induction par les esters de phorbol et l'acide butyrique,
30 est ajouté dans le flacon de culture afin de réaliser une infection massive des lymphocytes B présents par la souche EBV B95 et donc une immortalisation bien plus probable de quelques clones B.

Les flacons contenant les lymphocytes en
35 suspension sont maintenus en culture au moins trois mois pendant lesquels la survenue de clones de lymphocytes B

immortalisés, proliférant sous forme de "grappes" de cellules flottant dans le milieu de culture, est surveillée au microscope optique.

Lorsque des lignées lymphoblastoïdes sont établies, à partir de patients atteints de PR, elles sont régulièrement dédoublées et maintenues en culture continue. Les surnageants collectés deux fois par semaine à l'occasion des changements de milieu sont congelés à -80°C pour une analyse ultérieure : activité transcriptase inverse, détection PCR du génomes des agents pathogènes et/ou infectants exprimés par les cellules B dans la culture, etc.. Des utilisations de ces cultures pour la mise en évidence et la caractérisation d'agents pathogènes et/ou infectants associés à la PR, seront présentées dans les exemples suivants.

EXEMPLE 9 : OBTENTION DE CLONES MSRV-2 et MSRV-1 PAR AMPLIFICATION DES REGIONS POL CONSERVEES DES GENES D'ADN POLYMERASE-ARN DEPENDANTE SUR UNE PREPARATION D'AGENT PATHOGENE ET/OU INFECTANT PURIFIE A PARTIR DE CULTURE DE CELLULES DU LIQUIDE SYNOVIAL OU DE LIGNEE LYMPHOBLASTOÏDE DE PR.

L'approche moléculaire a consisté, comme dans l'exemple 1, à utiliser la technique PCR de Shih (8) qui permet d'amplifier une région relativement conservée du gène *pol* des rétrovirus exogènes et endogènes, mais aussi des virus codant pour une enzyme à activité transcriptase inverse (RT) tels que notamment le virus de l'hépatite B et, implicitement, de tout gène d'ADN polymérase ARN dépendante ou d'enzyme présentant des homologies de séquences suffisantes dans les régions définies par les amorces d'amplification utilisées. Cette technique PCR a été utilisée sur les acides nucléiques extraits d'une préparation d'agent infectant purifiée sur gradient selon le protocole décrit par Perron H. (14) à partir des surnageants d'une culture de cellules du liquide

articulaire (LA) pathologique d'un cas de polyarthrite
rhumatoïde (PR), obtenue selon le protocole décrit dans
l'exemple 7. Les fractions contenant le pic d'activité RT
mesurée selon les conditions optimisées pour la souche LM7
5 (7) sont reprises dans un volume d'un tampon contenant du
thiocyanate de guanidine et sont stockées à -80°C jusqu'à
extraction des acides nucléiques selon la technique
décrite par Chomzynski P. (15).

Préalablement à la réaction PCR, l'ARN de
10 l'échantillon a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc)
avec des amorces dites "random" (hexanucléotides en
mélange) à l'aide du Kit "ADNc synthesis system plus"
(Amersham), selon les instructions du fabricant et en se
basant sur une valeur approximative à un log près de la
15 quantité d'ARN présente dans l'échantillon.
Alternativement, la synthèse du ADNc peut s'effectuer
directement en présence des amorces utilisées pour la PCR
selon un protocole de "RT-PCR" en une étape décrit dans le
document EP-A-0569272.

20 L'ADN obtenu après amplification PCR de l'ADNc, a
été inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning®
(British Biotechnology), répliqué, extrait et séquencé
selon les protocoles décrits dans les exemples 1 et 2.

Les séquences obtenues ont ensuite été analysées à
25 l'aide des logiciels Mac Vector® et Geneworks® sur banque
de données informatiques Genbank®, pour les séquences
nucléiques, et Swiss Prot®, pour les séquences en acides
aminés déduites des trames de lecture mises en évidence
dans les séquences nucléiques. L'analyse des séquences
30 obtenues à partir de l'échantillon de particules
sédimentant au pic d'activité transcriptase inverse
provenant des surnageants décongelés de culture de
cellules du LA de PR, a mis en évidence deux types de
séquences: un premier type de séquence, retrouvé dans la
35 minorité des clones correspond à des séquences
significativement homologues à la région "pol" équivalente

du rétrovirus MSRV-1 préalablement isolé et caractérisé chez des patients atteints de SEP (demandes de brevet français 92 04322, 92 13447, 92 13443, 92 01529, 94 01530, 94 01531, 94 01532), et un second type de séquence, 5 retrouvé dans la majorité des clones, qui correspond à des séquences très fortement homologues à la séquence attribuée à un agent infectant et/ou pathogène dénommé MSRV-2 préalablement isolé et caractérisé chez des patients atteints de SEP (demandes de brevet français 10 92 04322, 92 13447, 92 13443, 92 01529, 94 01530, 94 01531, 94 01532).

La comparaison entre une séquence de type MSRV-1 amplifiée et clonée à partir de matériel viral produit par une culture de cellules de LA de PR (clone "MSRV1polPR", 15 SEQ ID N039) et les séquences de référence MSRV-1 clonées à partir de virion produit par des cellules provenant de patients atteints de SEP est présentée dans la figure 14.

La comparaison entre une séquence de type MSRV-2 amplifiée et clonée à partir de matériel infectieux 20 produit par une culture de cellules de LA de PR (clone "MSRV2sPR" SEQ ID N040) et les séquences de référence MSRV-2 clonées à partir de matériel infectieux produit par des cellules provenant de patients atteints de SEP est présentée dans la figure 15.

25 Les deux types de séquences retrouvées avec les amorces dégénérées "transcriptases inverses" de Shih et coll. (8) correspondent donc exactement à ce qui a été trouvé dans des conditions similaires, dans les cultures de cellules leptoméningées, de plexus choroïdes ou de 30 lignées lymphoblastoïdes B provenant de différents patients atteints de SEP (demandes de brevet français 92 04322, 92 13447, 92 13443, 92 01529, 94 01530, 94 01531, 94 01532).

35 **EXEMPLE 10 : VERIFICATION, A L'AIDE D'AMORCES PCR SPECIFIQUES ET D'UNE HYBRIDATION SPECIFIQUE SELON LA**

TECHNIQUE ELOSA, DE LA PRESENCE DES SEQUENCES MSRV-1 ET MSRV2 DANS LES SURNAGEANTS DE CULTURE DE CELLULES ET, DIRECTEMENT, DANS LES FLUIDES BIOLOGIQUES DE PATIENTS ATTEINTS DE PR

5 Plusieurs techniques PCR ont été utilisées pour détecter les génomes MSRV-1 et MSRV-2 dans des surnageants de culture de cellules, des plasmas et des liquides articulaires de patients atteints de PR et de patients atteints d'autres maladies rhumatismales (non-PR).

10 L'extraction des ARN de plasma et de surnageant de cultures a été effectuée selon la technique décrite par P.Chomzynski (15), après addition d'un volume du tampon contenant du guanidinium thiocyanate à 1 ml de plasma ou de surnageant de culture gardé congelé à -80°C après
15 recueil.

L'extraction des ARN de liquide articulaire (LA) et de cellules mononuclées sanguines (lymphocytes et monocytes) a été effectuée selon le protocole suivant:

toutes les solutions sont réalisées dans de l'eau
20 distillée traitée par le DEPC pour éliminer toute trace d'ARNase;

500 µl à 1 ml de LA sont décongelés et 1/100ème de volume d'une solution à 20% de SDS y est ajouté ainsi qu'une solution de protéinase K à raison de 7 µl par ml de
25 LA; le liquide est brièvement vortexé et incubé à 37°C après addition de RNasin (Boehringer) ou de RNA guard (Pharmacia); après 1 h d'incubation, 1 volume de tampon GUT selon Chomzynski (15) est ajouté et le mélange immédiatement vortexé. Par la suite, l'ARN présent dans le
30 mélange est extrait selon le protocole précité décrit par Chomzynski (15).

Pour la détection de MSRV2, la séquence MSRV-2EL1 (SEQ ID N012) a permis de définir plusieurs couples d'amorces oligonucléotidiques utilisables pour
35 l'amplification d'ADN ou d'ARN spécifiques par la technique PCR.

Les premiers couples d'amorces MSRV2 définis ci-après ont permis de réaliser une détection spécifique du génome MSRV-2 dans différentes cellules humaines, par une étape de PCR, ou de RT-PCR selon un un procédé d'amplification d'ARN tel que décrit dans le document EP-A-0 569 272.

Les amorces utilisées sont les suivantes:

amorce 5', identifiée par SEQ ID N014
 10 5'GTAGTTCGATGTAGAAAGCG 3'
 amorce 3', identifiée par SEQ ID N015
 5'GCATCCGGCAACTGCACG 3'

La PCR est effectuée selon une succession de 35 cycles enchaînant, après l'étape de synthèse de l'ADNc, 15 1 min, à 94°C, 1 min, à 54°C et 1 min, à 72°C.

Pour cet exemple, l'ARN total extrait de différents types de cellules (15), sans traitement par la DNase, a été utilisé dans cette réaction RT-PCR, ce qui permet une détection d'ARN et d'ADN spécifiques du pathogène dans l'extrait d'acides nucléiques enrichi en ARN. En effet, notre expérience montre que de l'ADN spécifique de MSRV2 peut être facilement détecté dans les acides nucléiques extraits selon le protocole sus-cité normalement destiné à l'extraction d'ARN.

25 La séquence d'un clone "MSRV2cPR" amplifié selon cette technique avec les amorces PCR SEQ ID N014 et SEQ ID N015 à partir de cellules cultivées d'un liquide articulaire d'un patient atteint de PR est présentée dans la figure 16. Dans les figures 17 et 18, sont représentés 30 les alignements de la séquence du clone "MSRV2cPR" avec les séquences nucléotidiques MSRV2 SEQ ID N010 et SEQ ID N012, respectivement, des clones obtenus chez des patients atteints de SEP. On peut constater que les séquences provenant d'échantillons de PR ou de SEP, sont 35 significativement homologues.

Les nouveaux couples d'amorces MSRV2 définis ci-

après ont permis de réaliser une détection spécifique du génome MSRV-2 dans différents fluides biologiques de patients, par deux étapes successives de PCR (dite "nichée"), ou de RT-PCR selon un un procédé
5 d'amplification d'ARN tel que décrit dans le document EP-A-0 569 272, les séquences MSRV-2 pouvant être détectées sous forme d'ARN ou d'ADN dans les échantillons biologiques.

Cette PCR "nichée" est effectuée sur des
10 échantillons d'acides nucléiques extraits selon ce qui a été décrit et n'ont pas été traités par la DNase.

Les amorces utilisées pour la première étape de 40 cycles avec une température d'hybridation de 48°C sont les suivantes:

15

amorce 5', identifiée par SEQ ID N044

5'GCCGATATCACCCGCCATGG 3'

amorce 3', identifiée par SEQ ID N015

5'GCATCCGGCAACTGCACG 3'

20

Après cette étape, 10 µl du produit d'amplification sont prélevés et utilisés pour réaliser une deuxième amplification PCR dite "nichée" avec des amorces situées à l'intérieur de la région déjà amplifiée.
25 Cette deuxième étape se déroule sur 35 à 40 cycles, avec une température d'hybridation des amorces ("annealing") de 50°C. Le volume réactionnel est de 100 µl.

Les amorces utilisées pour la deuxième étape sont les suivantes:

30

amorce 5', identifiée par SEQ ID N045

5' CGCGATGCTGGTTGGAGAGC 3'

amorce 3', identifiée par SEQ ID N046

5' TCTCCACTCCGAATATTCCG 3'

35

Les résultats obtenus dans une série de PCR MSRV-2

effectuée selon la technique "PCR nested" sus-décrite sont présentés dans le tableau II annexé à la présente description.

Pour MSRV-1, l'amplification a été effectuée en 5 deux étapes (PCR "nichée"), précédée d'une étape de synthèse de l'ADNc. De plus, l'échantillon d'acides nucléiques est préalablement traité par la DNase et un contrôle PCR sans RT (transcriptase inverse AMV) est effectué sur les deux étapes d'amplification de manière à 10 vérifier que l'amplification RT-PCR provient exclusivement de l'ARN MSRV-1. En cas de contrôle sans RT positif, l'échantillon aliquoté d'ARN de départ est à nouveau traité par la DNase et amplifié à nouveau.

Le protocole de traitement par la DNase dépourvue 15 d'activité RNase est le suivant: l'ARN extrait est aliquoté en présence de "RNase inhibitor" (Boehringer-Mannheim) dans de l'eau traitée au DEPC à une concentration finale de 1 μ g dans 10 μ l; à ces 10 μ l, est ajouté 1 μ l de "RNase-free DNase" (Boehringer-Mannheim) et 20 1,2 μ l de tampon à pH 5 contenant 0,1 M/l d'acétate de sodium et 5 mM/l de MgSO₄; le mélange est incubé 15 min. à 20°C et porté à 95°C pendant 1,5 min. dans un "thermocycler".

La première étape de RT-PCR MSRV-1 peut être 25 effectuée selon une variante du procédé d'amplification d'ARN tel que décrit dans le document EP-A-0 569 272. Notamment, l'étape de synthèse d'ADNc est effectuée à 42°C pendant une heure, mais la synthèse de l'ADNc est mieux réalisée en suivant le protocole suivant: l'ARN traité à 30 la DNase et maintenu dans la glace est chauffé à 65°C pendant 10 min., puis aussitôt plongé dans la glace; il est ensuite ajouté à un mélange maintenu à 42°C dans le thermocycler destiné à la PCR et contenant, dans du tampon PCR 1X, du MgCl₂ 1,5 mM, chaque dNTP à 250 μ M, chaque 35 amorce (5' et 3' de la première étape de PCR) à 300-400 nM, 10 Unités de RT-AMV et 2,5 unités de Taq, dans un

volume final de 100 μ l; ce mélange est maintenu à 42°C pendant 1 à 2 h, puis porté à 95°C pendant 5 min. afin de dénaturer la RT-AMV. Les cycles d'amplification PCR débutent à la suite et se déroulent sur 40 cycles, avec
5 une phase d'hybridation des amorces ("annealing") à 53°C pendant 1 min., une phase d'élongation à 72°C pendant 2 à 3 min. et une phase de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 1 min.

Les amorces utilisées pour cette première étape
10 sont les suivantes:

amorce 5'

5'AGGAGTAAGGAAACCCAACGGAC 3' SEQID N°16

amorce 3'

15 5'TAAGAGTTGCACAAGTGCG 3' SEQID N°17

Après cette étape, 10 μ l du produit d'amplification sont prélevés et utilisés pour réaliser une deuxième amplification PCR dite "nichée" avec des
20 amorces situées à l'intérieur de la région déjà amplifiée. Les cycles d'amplification PCR se déroulent sur 35 à 40 cycles, avec une phase d'hybridation des amorces ("annealing") à 53°C pendant 1 min., une phase d'élongation à 72°C pendant 1 à 2 min., et une phase de
25 dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 1 min. La composition du mélange réactionnel est le même que pour l'étape précédente, à l'exception de la RT-AMV qui n'y est pas ajoutée cette fois.

Les amorces utilisées pour cette deuxième étape
30 sont les suivantes:

amorce 5', identifiée par SEQ ID N018

5'TCAGGGATAGCCCCCATCTAT 3'

amorce 3', identifiée par SEQ ID N019

35 5'AACCCTTTGCCACTACATCAATTT 3'

La séquence d'un clone "MSRV1nPR" amplifié selon la technique sus-décrite avec les amorces PCR SEQ ID N016 et SEQ ID N°17, puis SEQ ID N018 et SEQ ID N019 à partir d'ARN d'un liquide articulaire d'un patient atteint de PR est présentée dans la figure 19. Dans la figure 20, est représenté l'alignement de la séquence du clone "MSRV1nPR" avec la séquence nucléotidique MSRV1 SEQ ID N01 du clone de référence obtenu chez des patients atteints de SEP. On peut, ici aussi, constater que les séquences provenant de PR ou de SEP sont significativement homologues.

A ce jour, les autres séquences MSRV1 et MSRV2 amplifiées selon ces techniques PCR à partir d'échantillons de PR se sont aussi révélées identiques ou homologues aux séquences obtenues chez les patients atteints de SEP.

Dans une série de PCR MSRV-1 effectuée selon la technique "RT-PCR" nested sus-décrite, on a obtenu les résultats présentés dans le tableau I annexé à la présente description.

Le génome rétroviral MSRV-1 et le génome MSRV-2 sont donc bien retrouvés dans les prélèvements de fluides biologiques de patients atteints de PR. D'autres résultats obtenus sur des séries plus étendues confirment ces résultats.

Par ailleurs, la spécificité des séquences amplifiées par ces techniques PCR peut être vérifiée et évaluée par la technique "ELOSA" telle que décrite par F. Mallet (22) et dans le document FR-2 663 040.

Pour MSRV-1 les produits de la PCR nichée sus-décrite peuvent être testés dans deux systèmes ELOSA permettant de détecter séparément un consensus A et un consensus B + C + D de MSRV-1, correspondant aux sous-familles décrites dans l'exemple 2 et les figures 2, 3 et 4. En effet, les séquences proches du consensus B + C + D sont retrouvées essentiellement dans les échantillons d'ARN provenant de virions MSRV-1 purifiés à partir de

cultures ou amplifiés dans des liquides biologiques extra-cellulaires de patients PR ou SEP, alors que les séquences proches du consensus A sont essentiellement retrouvées dans l'ADN cellulaire humain normal.

5 Le système ELOSA/MSRV-1 pour la capture et l'hybridation spécifique des produits PCR de la sous-famille A utilise un oligonucléotide de capture cpV1A avec une liaison amine en 5' selon une technique décrite dans le document FR-A-2 663 040, et un oligonucléotide de
10 détection dpV1A couplé à la peroxydase selon une technique décrite dans le document FR-A-2 663 040 (ou éventuellement couplé à la biotine) ayant respectivement pour séquence:

cpV1A 5' GATCTAGGCCACTTCTCAGGTCCAGS 3' SEQ ID N047
15 dpV1A 5' CATCTITTTGGICAGGCAITAGC 3' SEQ ID N048

Le système ELOSA/MSRV-1 pour la capture et l'hybridation spécifique des produits PCR de la sous-famille B+C+D utilise le même oligonucléotide de détection
20 dpV1A couplé à la peroxydase selon la technique précédemment décrite (ou éventuellement couplé à la biotine) et un oligonucléotide de capture cpV1B avec une liaison amine en 5' selon la technique précédemment décrite ayant pour séquence:

25

cpV1B 5' CTTGAGCCAGTTCTCATACCTGGA 3' SEQ ID N049

Ainsi qu'on peut le voir dans le tableau I, une telle technique a été appliquée aux produits PCR amplifiés
30 à partir des fluides biologiques de patients atteints de diverses maladies rhumatologiques : tous les patients atteints de PR qui présentaient une bande d'ADN amplifié de la taille attendue détectable sur gel d'agarose marqué au BET, étaient positifs pour MSRV1 type B + C + D et
35 négatif pour MSRV1-A; un seul témoin non-PR présentait une bande amplifiée visible sur gel marqué au BET, d'une

taille apparemment correcte ; le produit PCR correspondant s'est avéré négatif en ELOSA MSRV1-A et MSRV1-BCD, ainsi que l'ensemble des produits PCR des autres témoins non-PR; après clonage et séquençage de ce produit amplifié, il s'est avéré que celui-ci correspondait à une séquence artéfactuelle sans rapport avec MSRV1.

La technique ELOSA MSRV1 couplée à la RT-PCR nichée définie précédemment permet donc de réaliser un test de détection très sensible et très spécifique d'un rétrovirus MSRV 1 dans les fluides biologiques de patients.

Il est donc aussi envisageable, grâce aux découvertes effectuées et aux méthodes mises au point par les inventeurs dans le cadre de la polyarthrite rhumatoïde, de réaliser un diagnostic de l'infection et/ou de la réactivation MSRV-1 et/ou MSRV-2 et d'évaluer une thérapie dans la PR sur la base de son efficacité à "négativer" la détection de ces agents dans les fluides biologiques des patients. De plus, la détection précoce chez des personnes ne présentant pas encore de signes rhumatologiques de PR, pourrait permettre d'instaurer un traitement d'autant plus efficace sur l'évolution clinique ultérieure qu'il précéderait le stade lésionnel qui correspond à l'apparition de l'atteinte articulaire. Or, à ce jour, un diagnostic de PR ne peut être établi avant l'installation d'une symptomatologie inflammatoire voire lésionnelle et, donc, aucun traitement n'est instauré avant l'émergence d'une clinique évocatrice d'une atteinte articulaire déjà notable.

Le diagnostic d'une infection et/ou réactivation de MSRV-1 et/ou MSRV-2 chez l'homme est donc déterminant et la présente invention fournit les moyens d'un tel diagnostic aussi bien dans le cadre d'une symptomatologie neurologique (SEP) ou rhumatologique (PR) associées, ou encore dans le cadre d'une infection/réactivation pré-symptomatique ou non-encore associée à une clinique bien

caractérisée.

Il est ainsi possible, outre de réaliser un diagnostic de l'infection et/ou de la réactivation MSRV-1 et/ou MSRV-2, d'évaluer une thérapie dans la SEP, la PR ou
5 tout autre symptomatologie clinique associée sur la base de son efficacité à "négativer" la détection de ces agents dans les fluides biologiques des patients.

TABLEAU I

Résultats de la détection par PCR suivie d'une hybridation selon la technique dite ELOSA, des génomes MSRV-1 dans les fluides biologiques de malades atteints de PR et d'autres maladies rhumatologiques.

Diagnostic	Effectif testé	Echantillon	RT-PCR Nichée MSRV-1 (bande BET)	ELOSA MSRV-1 sous-type A	ELOSA MSRV-1 sous-type B (B+C+D)
Témoin non-PR Rhumatolo- gique	10	Milieu culture cellules LA	10 - 0 +	10 - 0 +	10 - 0 +
PR	10	Milieu culture cellules LA	5 - 5 +	10 - 0 +	5 - 5 +
Témoin non-PR rhumatolo- gique	8	Liquide articulaire	8 - 0 +	8 - 0 +	8 - 0 +
PR	5	Liquide articulaire	3 - 2 +	5 - 0 +	3 - 2 +
Témoin non-PR rhumatolo- gique	7	Plasma	6 - 1 +	7 - 0 +	7 - 0 +
PR	6	Plasma	4 - 2 +	6 - 0 +	4 - 2 +
Témoin non-PR rhumatolo- gique	4	Cellules mono nuclées du sang (culot sec)	4 - 0 +	4 - 0 +	4 - 0 +
PR	2	cellules mono nuclées du sang (culot sec)	0 - 2 +	2 - 0 +	0 - 2 +

TABLEAU II

Résultats de la détection par PCR suivie d'une hybridation selon la technique dite ELOSA, des génomes MSRV-2 dans les fluides biologiques de malades atteints de PR et d'autres maladies rhumatologiques.

Diagnostic	Effectif testé	Echantillon	RT-PCR Nichée MSRV-2 (bande BET)	REMARQUES
Témoin non-PR rhumatologique	4	Liquide articulaire	4 -	
			0 +	
PR	5	Liquide articulaire	1 -	
			4 +	
Témoin non-PR rhumatologique	5	Plasma	4 -	patient positif = polytransfusé
			1 +	
PR	8	Plasma	6 -	
			2 +	

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

5

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: BIOMERIEUX
(B) RUE: AUCUNE
(C) VILLE: MARCY L'ETOILE
10 (E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 69280

(ii) TITRE DE L' INVENTION: SEP EXTENSION

15 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 38

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
20 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1158 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
30 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CCCTTTGCCA CTACATCAAT TTTAGGAGTA AGGAAACCCA ACGGACAGTG GAGGTTAGTG 60
CAAGAACTCA GGATTATCAA TGAGGCTGTT GTTCCTCTAT ACCCAGCTGT ACCTAACCCCT 120
TATACAGTGC TTTCCCAAAT ACCAGAGGAA GCAGAGTGGT TTACAGTCCT GGACCTTAAG 180
40 GATGCCCTTT TCTGCATCCC TGTACGTCCT GACTCTCAAT TCTTGTTTGC CTTTGAAGAT 240
CCTTTGAACC CAACGTCTCA ACTCACCTGG ACTGTTTTAC CCCAAGGGTT CAGGGATAGC 300
CCCCATCTAT TTGGCCAGGC ATTAGCCCAA GACTTGAGTC AATTCTCATA CCTGGACACT 360
CTTGTCCTTC AGTACATGGA TGATTTACTT TTAGTCGCCC GTTCAGAAAC CTTGTGCCAT 420
CAAGCCACCC AAGAACTCTT AACTTTCCTC ACTACCTGTG GCTACAAGGT TTCCAAACCA 480
45 AAGGCTCGGC TCTGCTCACA GGAGATTAGA TACTNAGGGC TAAAATTATC CAAAGGCACC 540
AGGGCCCTCA GTGAGGAACG TATCCAGCCT ATACTGGCTT ATCCTCATCC CAAAACCCTA 600
AAGCAACTAA GAGGGTTCCT TGGCATAACA GGTTTCTGCC GAAAACAGAT TCCCAGGTAC 660
ASCCCAATAG CCAGACCATT ATATACTA ATTANGGAAA CTCAGAAAGC CAATACCTAT 720
TTAGTAAGAT GGACACCTAC AGAAGTGGCT TTCCAGGCCC TAAAGAAGGC CCTAACCCAA 780
50 GCCCCAGTGT TCAGCTTGCC AACAGGGCAA GATTTTCTT TATATGCCAC AGAAAAACA 840
GGAATAGCTC TAGGAGTCCT TACGCAGGTC TCAGGGATGA GCTTGCAACC CGTGGTATAC 900
CTGAGTAAGG AAATTGATGT AGTGGCAAAG GGTTGGCCTC ATNGTTTATG GGTAATGGNG 960
GCAGTAGCAG TCTNAGTATC TGAAGCAGTT AAAATAATAC AGGGAAGAGA TCTTNCTGTG 1020
TGGACATCTC ATGATGTGAA CGGCATACTC ACTGCTAAAG GAGACTTGTG GTTGTCTAGAC 1080

AACCATTTAC TTAANTATCA GGCTCTATTA CTTGAAGAGC CAGTGCTGNG ACTGCGCACT1140
TGTGCAACTC TTAAACCC 1158

5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 297 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
10 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CCCTTTGCCA CTACATCAAT TTTAGGAGTA AGGAAACCCA ACGGACAGTG GAGGTTAGTG 60
CAAGAACTCA GGATTATCAA TGAGGCTGTT GTTCCTCTAT ACCCAGCTGT ACCTAACCCCT 120
TATACAGTGC TTTCCCAAAT ACCAGAGGAA GCAGAGTGGT TTACAGTCCT GGACCTTAAG 180
20 GATGCCTTTT TCTGCATCCC TGTACGTCCT GACTCTCAAT TCTTGTTTGC CTTTGAAGAT 240
CCTTTGAACC CAACGTCTCA ACTCACCTGG ACTGTTTTAC CCCAAGGGTT CAAGGGA 297

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 85 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
30 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

35 GTTTAGGGAT ANCCCTCATC TCTTTGGTCA GGTACTGGCC CAAGATCTAG GCCACTTCTC 60
AGGTCCAGSN ACTCTGTYCC TTCAG 85

40 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 86 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
45 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

50 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GTTCAGGGAT AGCCCCCATC TATTTGGCCA GGCCTAGCT CAATACTTGA GCCAGTTCTC 60
ATACCTGGAC AYTCTYGTCC TTCGGT 86

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 85 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GTTCARRGA TAGCCCCCATC TATTTGGCCW RGYATTAGCC CAAGACTTGA GYCAATTCTC 60
 15 ATACCTGGA CACTCTTGTCC TTYRG 85

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 85 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

30 GTTCAGGGAT AGCTCCCATC TATTTGGCCT GGCATTAACC CGAGACTTAA GCCAGTTCTY 60
 ATACGTGGAC ACTCTTGTCC TTTGG 85

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- 35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 111 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 40 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

45 GTGTTGCCAC AGGGGTTTAR RGATANCYCY CATCTMTTTG GYCWRGYAYT RRCYCRAKAY 60
 YTRRGYCAVT TCTYAKRYSY RGSNAYTCTB KYCCTTYRGT ACATGGATGA C 111

50

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 645 paires de bases

65

- (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

```

10 TCAGGGATAG CCCCCATCTA TTTGGCCAGG CATTAGCCCA AGACTTGAGT CAATTCTCAT 60
    ACCTGGACAC TCTTGTCTT CAGTACATGG ATGATTTACT TTTAGTCGCC CGTTCAGAAA 120
    CCTTGTGCCA TCAAGCCACC CAAGAACTCT TAACTTTCCT CACTACCTGT GGCTACAAGG 180
    TTTCCAAACC AAAGGCTCGG CTCTGCTCAC AGGAGATTAG ATACTNAGGG CTAAAATTAT 240
    CCAAAGGCAC CAGGGCCCTC AGTGAGGAAC GTATCCAGCC TATACTGGCT TATCCTCATC 300
    CCAAACCCCT AAAGCAACTA AGAGGGTTCC TTGGCATAAC AGGTTTCTGC CGAAAACAGA 360
15 TTTCCAGGTA CASCCTAATA GCCAGACCAT TATATACACT AATTANGGAA ACTCAGAAAAG 420
    CCAATACCCTA TTTAGTAAGA TGGACACCTA CAGAAGTGGC TTTCCAGGCC CTAAAGAAGG 480
    CCCTAACCCA AGCCCCAGTG TTCAGCTTGC CAACAGGGCA AGATTTTCTT TTATATGCCA 540
    CAGAAAAAAC AGGAATAGCT CTAGGAGTCC TTACGCAGGT CTCAGGGATG AGCTTGCAAC 600
    CCGTGGTATA CCTGAGTAAG GAAATTGATG TAGTGGCAAA GGGTT 645
20

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- 25 (A) LONGUEUR: 741 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

```

35 CAAGCCACCC AAGAACTCTT AAATTTCTC ACTACCTGTG GCTACAAGGT TTCCAAACCA 60
    AAGGCTCAGC TCTGCTCACA GGAGATTAGA TACTTAGGGT TAAAATTATC CAAAGGCACC 120
    AGGGGCCTCA GTGAGGAACG TATCCAGCCT ATACTGGGT ATCCTCATCC CAAAACCCTA 180
    AAGCAACTAA GAGGGTTCCT TAGCATGATC AGGTTTCTGC CGAAAACAAG ATTCCCAGGT 240
    ACAACCAAAA TAGCCAGACC ATTATATACA CTAATTAAGG AAACTCAGAA AGCCAATACC 300
    TATTTAGTAA GATGGACACC TAAACAGAAG GCTTTCAGG CCTAAAGAA GGCCCTAACC 360
40 CAAGCCCCAG TGTTCAGCTT GCCAACAGG CAAGATTTT CTTTATATGG CACAGAAAAA 420
    ACAGGAATCG CTCTAGGAGT CCTTACACAG GTCCGAGGGA TGAGCTTGCA ACCCGTGGCA 480
    TACCTGAATA AGGAAATTGA TGTAGTGGCA AAGGGTTGGC CTCATNGTTT ATGGGTAATG 540
    GNGGCAGTAG CAGTCTNAGT ATCTGAAGCA GTTAAATAA TACAGGGAAG AGATCTTNCT 600
    GTGTGGACAT CTCATGATGT GAACGGCATA CTCACTGCTA AAGGAGACTT GTGGTTGTCA 660
45 GACAACCATT TACTTAANTA TCAGGCTCTA TTAATTGAAG AGCCAGTGCT GNGACTGCGC 720
    ACTTGTGCAA CTCTTAAACC C 741

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

50

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 93 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

66

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

TGGAAAGTGT TGCCACAGGG CGCTGAAGCC TATCGCGTGC AGTTGCCGGA TGCCGCCTAT 60
 AGCCTCTACA TGGATGACAT CCTGCTGGCC TCC 93

10

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 15 (A) LONGUEUR: 96 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

TTGGATCCAG TGYTGCCACA GGGCGCTGAA GCCTATCGCG TGCAGTTGCC GGATGCCGCC 60
 TATAGCCTCT ACGTGGATGA CCTSCTGAAG CTTGAG 96

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 30 (A) LONGUEUR: 748 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

40 TGCAAGCTTC ACCGCTTGCT GGATGTAGGC CTCAGTACCG GNGTGCCCCG CGCGCTGTAG 60
 TTCGATGTAG AAAGCGCCCG GAAACACGCG GGACCAATGC GTCGCCAGCT TGCGCGCCAG 120
 CGCCTCGTTG CCATTGGCCA GCGCCACGCC GATATCACCC GCCATGGCGC CGGAGAGCGC 180
 CAGCAGACCG GCGGCCAGCG GCGCATTCTC AACGCCGGGC TCGTCGAACC ATTCGGGGGC 240
 GATTTCCGCA CGACCGCGAT GCTGGTTGGA GAGCCAGGCC CTGGCCAGCA ACTGGCACAG 300
 GTTCAGGTAA CCCTGCTTGT CCCGCACCAA CAGCAGCAGG CGGGTCGGCT TGTCGCGCTC 360
 45 GTCGTGATTG GTGATCCACA CGTCAGCCCC GACGATGGGC TTCACGCCCT TGCCACGCGC 420
 TTCCTTGTAG ANGCGACCA GCCCGAAGGC ATTGGCGAGA TCGGTCAGCG CCAAGGCGCC 480
 CATGCCATCT TTGGCGGCAG CCTTGACGGC ATCGTCGAGA CGGACATTGC CATCGACGAC 540
 GGAATATTCG GAGTGGAGAC GGAGGTGGAC GAAGCGCGGC GAATTCATCC GCGTATTGTA 600
 ACGGGTGACA CCTTCCGCA AGCATTCCGG ACGTGCCCGA TTGACCCGGA GCAACCCCGC 660
 50 ACGGCTGCGC GGGCAGTTAT AATTTCCGGT TACGAATCAA CGGGTTACCC CAGGGCGCTG 720
 AAGCCTATCG CGTGCAATTG CCGGATGC 748

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
5 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:
 GCATCCGGCA ACTGCACG 18
- 15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
20 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:
 GTAGTTCGAT GTAGAAAGCG 20
- 30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
35 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:
 GCATCCGGCA ACTGCACG 18
- 45 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
50 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

AGGAGTAAG GAAACCCAACG GAC 23

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 10 (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

TAAGAGTTGC ACAAGTGCG 19

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 25 (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

TCAGGGATAG CCCCCATCTA T 21

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 40 (A) LONGUEUR: paires de bases
(B) TYPE: 24 nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

AACCCTTTGC CACTACATCA ATTT 24

50

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
5 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (ix) CARACTERISTIQUES:
10 (B) EMBLACEMENT: 5, 7, 10, 13
(D) AUTRES INFORMATIONS: G repr_sente l'inosine (i)
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:
- 15 GGTCGTGCCG CAGGG 15
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:
- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
25 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:
- 30 TTAGGGATA GCCCTCATCTC T 21
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:
- 35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
40 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:
- 45 TCAGGGATAG CCCCATCTA T 21
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:
- 50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23

5

AACCCTTTGC CACTACATCA ATTT 24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

10

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 22 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

15

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24

20

GCGTAAGGAC TCCTAGAGCTA TT 22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

25

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

30

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25

35

TCATCCATGT ACCGAAGG 18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

40

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

45

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26

50

ATGGGGTTCC CAAGTTCCT 20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
5 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27
- GCGGATATCA CCCGCCATGG 20
- 15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 28:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
20 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28
- GCATCCGGCA ACTGCACG 18
- 30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 29:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
35 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29
- CGCGATGCTG GTTGGAGAGC 20
- 45 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 30:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
50 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30

TCTCCACTCC GAATATTCCG 20

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 10 (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31

GATCTAGGCC ACTTCTCAGG TCCAGS 26

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 25 (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

30

(ix) CARACTERISTIQUES:

- (B) EMPLACEMENT: 6, 12, 19
(D) AUTRES INFORMATIONS: G repr_sente l'inosine (i)

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32

CATCTGTTTG GGCAGGCAGT AGC 23

40 2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 45 (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

50 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33

CTTGAGCCAG TTTCATACC TGGA 24

2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 34:**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:**

- 5 (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34

AGTGYTRCCM CARGGCGCTG AA 22

15

2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 35:**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:**

- 20 (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35

GMGGCCAGCA GSAKGTCATC CA 22

30

2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 36:**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:**

- 35 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36

GGATGCCGCCT ATAGCCTCTAC 20

45

2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 37:**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:**

- 50 (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37

AAGCCTATCG CGTGCAGTTG CC 22

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 10 (A) LONGUEUR: 40 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

TAAAGATCTA GAATTCGGCT ATAGGCGGCA TCCGGCAAGT 40

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 39:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 25 (A) LONGUEUR: paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 39:

cf Figure 14

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 40:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 40 (A) LONGUEUR: paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 40:

cf Figure 15

50 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 41:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 40 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide

- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 41:
cf Figure 16

10 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 42:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- 15 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 42:
cf Figure 19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 43:

25

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- 30 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 43:
35 cf Figure 20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 44:

40

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

45

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 44:
GCCGATATCA CCCGCCATGG

50

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 45:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases

- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 45:
CGCGATGCTG GTTGGAGAGC

10 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 46:

 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- 15 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 46:
TCTCCACTCC GAATATTCCG

 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 47:

25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- 30 (D) CONFIGURATION: linéaire

 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 47:
GATCTAGGCC ACTTCTCAGG TCCAGS

35

 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 48:

 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 40 (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 48:
CATCTITTTG GICAGGCAIT AGC

50 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 49:

 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 49:
CTTGAGCCAG TTTCATACC TGGA

BIBLIOGRAPHIE

- (1) **Sauvezio B.** et coll., dans "Polyarthrite rhumatoïde, aspects actuels et perspectives", Sany J., 1-13, 5 Collection Médecine-Sciences Flammarion, Paris, 1987
- (2) **Kahen A.**, Virus et polyarthrite rhumatoïde, dans "Polyarthrite rhumatoïde, aspects actuels et perspectives", Sany J., 1-13, Collection Médecine-Sciences Flammarion, Paris, 1987
- 10 (3) **Fujinami R.S.** et Oldstone M.B.A., ed. Current Topics in Microbiology and Immunology, 145, Berlin, Springer Verlaq, 1989
- (4) **Acha-Orbea H.** et Palmer E., Mls -a retrovirus exploits the immune system- Immunology Today 1991 ; 12, 271-276
- 15 (5) **Cole B.C.** et Atkin C.L., The mycoplasma arthritidis T-cell mitogen, MAM : a model superantigen, Immunology Today 1991 ; 12, 271-276
- (6) **Posnet D.N.**, Do superantigens play a role in auto-immunity ? Semin. immunol. 1993 ; 5, 65-72
- 20 (7) **Perron H.** et coll., Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561
- (8) **Shih A.**, Misra R. et Rush M.G., Res. Virol. 1989 ; 63, 64-75
- (9) **Fields et Knipe**, Fundamental Virology 1986, Rev Press N.Y.
- 25 (10) **Nielsen P.E.** et coll, Science 1991; 254, 1497-1500
- (11) **Maniatis et al**, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982
- (12) **Southern. E.M.**, J. Mol. Biol. 1975 ; 98, 503
- (13) **Dunn A.R.** et Hassel J.A., Cell 1977 ; 12, 23
- 30 (14) **Perron H.** et coll., Res. Vir. 1992 ; 143, 337-350
- (15) **Chomzynski P.** et Sacchi N., Analytical Biochemistry 1987; 162, 156-159
- (16) **Sambrook J.**, Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor, 35 Laboratory Press, 1989
- (17) **Meyerhans et coll.**, Cell 1989 ; 58, 901-910

- (18) Linial M.L. and Miller A.D., "Current topics in microbiology and immunobiology. Retroviruses, strategies of replication" vol. 157, 125-152; Swanstrom R. et Vogt P.K., éditeurs, Springer-Verlag, Heidelberg 1990
- 5 (19) Lori F. et coll., J. Virol. 1992 ; 66, 5067-5074
- (20) La Mantia et coll., Nucleic Acids Research 1991 ; 19, 1513-1520
- (21) Frohman et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988 ; 85, 8998-9002
- 10 (22) Mallet F. et coll., Journal of Clinical Microbiology 1993 ; 31, 1444-1449

REVENDEICATIONS

1/ Utilisation d'un matériel viral, à l'état purifié ou isolé, possédant une activité transcriptase inverse, apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, issu d'une souche virale possédant une activité transcriptase inverse, choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et parmi leurs souches variantes consistant en des virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit matériel viral associé à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation dudit matériel.

2/ Utilisation d'un matériel viral, à l'état purifié ou isolé, possédant une activité transcriptase inverse, apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, produit par une lignée cellulaire choisie parmi les lignées dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201, et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, ou par toute culture cellulaire infectée susceptible de produire un virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus produits par les lignées PLI-2 et LM7PC précitées, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit matériel viral associé à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation dudit matériel.

3/ Utilisation d'un matériel viral dont le génome

comprend une séquence nucléotidique choisie parmi
SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04,
SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08,
SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043 leurs
5 séquences complémentaires, et leurs séquences
équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques
présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au
moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie
avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01,
10 SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05,
SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09,
SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043 et leurs séquences
complémentaires, pour obtenir une composition
diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour
15 détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit
matériel viral associé à la polyarthrite rhumatoïde, ou
une réactivation dudit matériel.

4/ Utilisation d'un matériel rétroviral, dont le
gène pol de son génome comprend une séquence nucléotidique
20 équivalente, et notamment présentant au moins 50 %
d'homologie, de préférence au moins 65% d'homologie avec
une séquence nucléotidique appartenant au gène pol du
génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9, pour obtenir une
composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique,
25 pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit
matériel viral associé à la polyarthrite rhumatoïde, ou
une réactivation dudit matériel.

5/ Utilisation d'un matériel rétroviral dont le
gène pol de son génome code pour une séquence peptidique
30 présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70%
d'homologie avec une séquence peptidique codée par le gène
pol du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9, pour obtenir
une composition diagnostique, prophylactique ou
thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une
35 infection par ledit matériel viral associé à la
polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation dudit

matériel.

6/ Utilisation d'un matériel rétroviral dont le gène *pol* de son génome code pour une séquence peptidique présentant, pour toute suite contigue d'au moins 30 acides aminés, au moins 50% et de préférence au moins 70% d'homologie avec une séquence peptidique codée par une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043 et leurs séquences complémentaires, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit matériel viral associé à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation dudit matériel.

7/ Utilisation d'un fragment nucléotidique, dont la séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043 leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50%, et de préférence au moins 70% d'homologie, avec une séquence choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043 et leurs séquences complémentaires, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique, pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit matériel viral associé à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation dudit matériel.

8/ Utilisation d'une amorce spécifique comprenant une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un

fragment défini à la revendication 7, notamment une séquence nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au moins 70% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment.pour l'amplification par
5 polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un matériel viral associé à la polyarthrite rhumatoïde.

9/ Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'amorce comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N016, SEQ ID N017,
10 SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020, SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025, SEQ ID N026, SEQ ID N031, SEQ ID N032, SEQ ID N033, SEQ ID N047, SEQ ID N048, SEQ ID N049 et leurs séquences complémentaires.

15 10/ Utilisation d'une sonde comprenant une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment défini à la revendication 6, notamment une séquence nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères
20 contigus, au moins 70% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment pour obtenir une composition pour détecter, séparer, ou identifier, dans un échantillon biologique, un matériel viral associé à la polyarthrite rhumatoïde.

25 11/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que la sonde comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N016, SEQ ID N017, SEQ ID N018, SEQ ID N019, SEQ ID N020,
30 SEQ ID N021, SEQ ID N022, SEQ ID N023, SEQ ID N024, SEQ ID N025, SEQ ID N026, SEQ ID N031, SEQ ID N032, SEQ ID N033, SEQ ID N047, SEQ ID N048, SEQ ID N049 et leurs séquences complémentaires.

12/ Utilisation d'un agent pathogène et/ou
35 infectant, à l'état purifié ou isolé, différent du matériel viral défini à l'une quelconque des

revendications 1 à 6, issu d'une souche virale choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202 et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et parmi leurs souches variantes, consistant en des agents pathogènes et/ou infectants comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants des souches virales POL-2 et MS7PG précitées, respectivement différents de l'un ou l'autre matériel rétroviral desdites souches, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit agent pathogène et/ou infectant associé à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation dudit agent.

13/ Utilisation d'un agent pathogène et/ou infectant, à l'état purifié ou isolé, différent du matériel viral défini à l'une quelconque des revendications 1 à 6, produit par une lignée cellulaire choisie parmi les lignées dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201 et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, et par toutes cultures cellulaires infectées susceptibles de produire au moins l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants, et/ou leurs variants, ou par toute culture cellulaire infectée susceptible de produire un agent pathogène et/ou infectant comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants produits par les lignées PLI-2 et LM7PC précitées, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit

agent pathogène et/ou infectant associé à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation dudit agent.

14/ Utilisation d'un agent pathogène et/ou infectant comprenant un acide nucléique comprenant une
5 séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques, présentant au moins 70% et préférentiellement au moins 90%
10 d'homologie avec une séquence nucléotidique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, et leurs séquences complémentaires, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour
15 détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit agent pathogène et/ou infectant associé à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation dudit agent.

15/ Utilisation d'un fragment nucléotidique, comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi
20 SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70%, et de préférence au
25 moins 90% d'homologie, avec une séquence choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, et leurs séquences complémentaires, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou traiter une
30 infection par ledit agent pathogène et/ou infectant associé à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation dudit agent.

16/ Utilisation d'une amorce comprenant une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins
35 une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment défini à la revendication 15, notamment une séquence

nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au moins 90% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment, pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un agent pathogène et/ou infectant associé à la polyarthrite rhumatoïde.

17/ Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N027, SEQ ID N028, SEQ ID N029, SEQ ID N030, SEQ ID N034, SEQ ID N035, SEQ ID N036, SEQ ID N037, SEQ ID N044, SEQ ID N045, SEQ ID N046 et leurs séquences complémentaires.

18/ Utilisation d'une sonde comprenant une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie de la séquence nucléotidique d'un fragment selon la revendication 15, notamment une séquence nucléotidique présentant, pour toute suite de 10 monomères contigus, au moins 90% d'homologie avec au moins une partie dudit fragment, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou traiter une infection par ledit agent pathogène et/ou infectant associé à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation dudit agent.

19/ Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N013, SEQ ID N014, SEQ ID N015, SEQ ID N027, SEQ ID N028, SEQ ID N029, SEQ ID N030, SEQ ID N034, SEQ ID N035, SEQ ID N036, SEQ ID N037, SEQ ID N044, SEQ ID N045, SEQ ID N046 et leurs séquences complémentaires.

20/ Utilisation d'une association comprenant deux agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé ou purifié, à savoir, un premier agent qui consiste en un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux

endogènes, ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant issus d'une même souche virale choisie parmi les souches dénommées respectivement
5 POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202 et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et parmi leurs souches variantes, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique
10 pour détecter, prévenir ou traiter une infection par un premier agent pathogène et/ou infectant, et un second agent pathogène et/ou infectant, associés à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation de l'un ou l'autre dudit premier agent et dudit second agent.

15 21/ Utilisation d'une association comprenant deux agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé -ou purifié, à savoir, un premier agent consistant en un virus humain possédant une activité transcriptase inverse, et apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes,
20 ou un variant dudit virus, et un second agent, ou un variant dudit second agent, ces deux agents pathogènes et/ou infectants étant produits par une même lignée cellulaire choisie parmi les lignées dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de
25 l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201 et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, et par toutes cultures cellulaires infectées susceptibles de produire au moins l'un ou l'autre des agents pathogènes et/ou infectants, et/ou leurs variants,
30 pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou traiter une infection par un premier agent pathogène et infectant, et par un second agent pathogène et/ou infectant, associés à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation de l'un ou
35 l'autre dudit premier agent et dudit second agent.

22/ Utilisation d'une association comprenant deux

agents pathogènes et/ou infectants, à l'état isolé ou purifié, à savoir un premier agent consistant en un virus, ou un variant dudit virus, dont le génome comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, 5 SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour 10 toute suite de 100 monomères contigus, au moins 50% et préférentiellement au moins 70% d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08, SEQ ID N09, 15 SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043, et leurs séquences complémentaires, et un second agent pathogène et/ou infectant, dont le génome comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011, SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, leurs séquences 20 complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70% et préférentiellement au moins 90% d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, 25 SEQ ID N011, SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, et leurs séquences complémentaires, pour obtenir une composition diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou traiter une infection par un premier agent pathogène et/ou infectant, et par un second 30 agent pathogène et/ou infectant, associés à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation de l'un ou l'autre dudit premier agent et dudit second agent.

23/ Utilisation d'une association de fragments nucléotidiques comprenant un premier fragment dont la 35 séquence nucléotidique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03,

SEQ ID N04, SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07,
SEQ ID N08, SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042,
SEQ ID N043, leurs séquences complémentaires, et leurs
séquences équivalentes, notamment les séquences
5 nucléotidiques présentant, pour toute suite de 100
monomères contigus, au moins 50% et de préférence au moins
70% d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie
parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04,
SEQ ID N05, SEQ ID N06, SEQ ID N07, SEQ ID N08,
10 SEQ ID N09, SEQ ID N039, SEQ ID N042, SEQ ID N043, et
leurs séquences complémentaires, et un second fragment
dont la séquence nucléotidique comprend une séquence
nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011,
SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, leurs séquences
15 complémentaires, et leurs séquences équivalentes,
notamment les séquences nucléotidiques présentant, pour
toute suite de 100 monomères contigus, au moins 70% et de
préférence au moins 90% d'homologie avec une séquence
nucléotidique choisie parmi SEQ ID N010, SEQ ID N011,
20 SEQ ID N012, SEQ ID N040, SEQ ID N041, et leurs séquences
complémentaires, chacun desdits fragments étant notamment
une sonde, pour obtenir une composition diagnostique,
prophylactique ou thérapeutique pour détecter, prévenir ou
traiter une infection par un premier agent pathogène et/ou
25 infectant, et un second agent pathogène et/ou infectant,
associés à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation
de l'un ou l'autre dudit premier agent et dudit second
agent.

24/ Utilisation d'une association comprenant un
30 premier polypeptide codé de manière partielle ou totale
par le premier fragment nucléotidique défini à la
revendication 23, et un second polypeptide codé de manière
partielle ou totale par le deuxième fragment nucléotidique
défini à la revendication 23, pour obtenir une composition
35 diagnostique, prophylactique ou thérapeutique pour
détecter, prévenir ou traiter une infection par un premier

agent pathogène et/ou infectant, et un second agent pathogène et/ou infectant, associés à la polyarthrite rhumatoïde, ou une réactivation de l'un ou l'autre dudit premier agent et dudit second agent.

5 25/ Utilisation selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'elle comprend un premier ligand, notamment anticorps, spécifique du premier polypeptide, et un second ligand, notamment anticorps, spécifique du second polypeptide, lesdits premier et second polypeptides
10 étant définis à la revendication 24.

 26/ Procédé d'obtention d'un premier agent pathogène et/ou infectant selon l'une des revendications 1 à 6 et/ou d'un second agent pathogène et/ou infectant selon l'une des revendications 13 ou 15, associés à la
15 polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce qu'on cultive in vitro des cellules de ponctions de liquide synovial notamment choisies parmi les synoviocytes et les fibroblastes desquamés de liquide articulaire, de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.

20 27/ Procédé d'obtention d'un premier agent pathogène et/ou infectant selon l'une des revendications 1 à 6 et/ou d'un second agent pathogène et/ou infectant selon l'une des revendications 13 ou 14, associés à la polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce qu'on cultive
25 in vitro des cellules lymphocytaires B immortalisées par le virus d'Epstein-Barr, de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.

1/23

FIG 1

pol SHH TGGAAAGTGT TGGACAGGG CCCTGAGGC TATGGGGTGC AGTTGGGGGA 50
pol SHH TGGGGCTAT AGCTCTACA TGGATGCAAT CCCTGCTGGC TCC 93

SEQ ID NO 10

FIG 5

Consensus TTGGATCCAG TGYTGCACA GGGGCTGAA GGCATGGG TGCAGTTGC 50
Consensus GGATGGGGC TATAGCTCT AGTGGATGA CCTCTGAAG CTTCAG 96

SEQ ID NO 11

2/23
FIG 2

Consensus GTTAGGGAT ANCOCTCATC TCTTGGTCA GGTACTGGOC CAAGATCTAG 50
Consensus GGCATCTCTC AGGTCCAGSN ACICIGTMC TTGAG 85

SEQ ID NO3

Consensus GTTAGGGAT AGOOOOCATC TATTGGGCA GGCATGCT CAATCTGA 50
Consensus GGCATCTCTC ATACCTGGAC ATCTGCTOC TTGGT 85

SEQ ID NO4

Consensus GTTAGGGAT AGOOOOCATC TATTGGGCA GGCATGCT CAATCTGA 50
Consensus GGCATCTCTC ATACCTGGAC ATCTGCTOC TTGGT 85

SEQ ID NO5

Consensus GTTAGGGAT AGOOOOCATC TATTGGGCT GGCATGCT CAATCTGA 50
Consensus GGCATCTCTC ATACCTGGAC ATCTGCTOC TTGGT 85

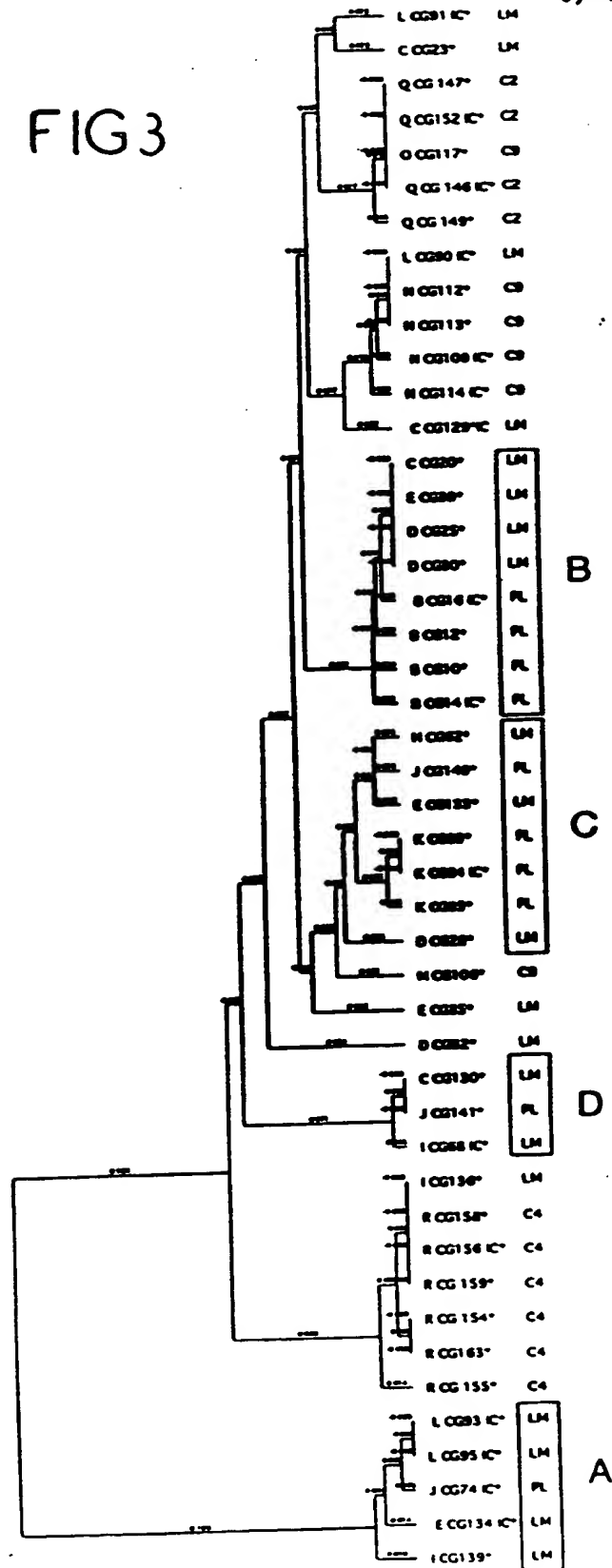
SEQ ID NO6

Consensus GTGTGOCAC AGGGGTTTAR RGATANCYCY CATCMTTG GYORGYAYT
Consensus RRCYCRKAY YIRGYCAVT TCTYAKRYSY RGSNATCTB KYOCTTYRGT
Consensus ACATGGATGA C

SEQ ID NO7

3/23

FIG 3



4/23 CONSENSUS A FIG4

GTTTAGGGATAGCCC TCATCTCTTTGGTCA GGTACTGGCCCAAGA TCTAGGCCACTTCTC 60
 V . G . P S S L W S G T G P R S R P L L
 F R D S P H L F G Q V L A Q D L G H F S
 L G I A L I S L V R Y W P K I . A T S Q

AGGTCCAGGCACTCT GTTCCTTCAG 85
 R S R H S V P S
 G P G T L F L Q
 V Q A L C S F

CONSENSUS B

GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTTGGCCA GGCCTAGCTCAATA CTTGAGCCAGTTCTC 60
 V Q G . P P S I W P G T S S I L E P V L
 F R D S P H L F G Q A L A Q Y L S Q F S
 S G I A P I Y L A R H . L N T . A S S H

ATACCTGGCACTCT TGTCTTCGGT 86
 I P G H S C P S
 Y L D T L V L R
 T W T L L S F G

CONSENSUS C

GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTTGGCCA GGCATTAGCCCAAGA CTTGAGTCAATTCTC 60
 V Q G . P P S I W P G I S P R L E S I L
 F R D S P H L F G Q A L A Q D L S Q F S
 S G I A P I Y L A R H . P K T . V N S H

ATACCTGGCACTCT TGTCTTCAG 85
 I P G H S C P S
 Y L D T L V L Q
 T W T L L S F

CONSENSUS D

GTTCAGGGATAGCTC CCATCTATTTGGCCT GGCATTAACCCGAGA CTTAAGCCAGTTCTC 60
 V Q G . L P S I W P G I N P R L K P V L
 F R D S S H L F G L A L T R D L S Q F S
 S G I A P I Y L A W H . P E T . A S S H

ATACGTGGCACTCT TGTCTTTGG 85
 I R G H S C P L
 Y V D T L V L W
 T W T L L S F

5/23

FIG 6

CAGGCAACC AGAACICTT AAATTTCCTC ACTACTGTG GCTCAAGGT	50
TTCACACCA AAGGCTGNC TCCTGCTACA GGAGATTGA TACTTAGGT	100
TAAATATC CAAGGCAC AGGGGCTCA GIGAGGAGG TTTCCAGCT	150
ATCTGGGT ATCTCATOC CAACACCA AGCACTAA GAGGTTCCT	200
TAGCTGTC AGGTTCGTC CGAAGCAG ATTCCAGGT ACACACAA	250
TAGCAGTC ATATATCA CTAATTAGG AACCTAGAA AGCAATOC	300
TATTGATA GAGGCTAC TAAAGGAG GCTTCAGG GCTACAGAA	350
GGGCTATC CAGGCGCG TGTACGCT GGCACAGG CAGGTCTT	400
CTTCTGTT CACGAAAA ACAGGATCG CTTAGGAGT CCTTCTAG	450
GTCAGGGA TGAGCTGCA ACCGCTGCA TCTCTAGTA AGCAATGA	500
TGTAGGGA AAGGTGTC CTCTGCTT ATGGGTATG GAGGCTAG	550
CGCTCTGT ATCTAGCA GTTAAATA TACAGGAG AGCTCTCT	600
GCTGCTAT CTCTGCTT GAGGCTATA CTCTGCTA AAGGCTCT	650
GCTGCTCA GCAACCTT TACTTATA TACGCTCA TACTTAGG	700
AGCAGCTT GACCTGCG ACTTGCTCA CTTTAAAC C	741

SEQ ID NO9

6/23

FIG 7

TCAGGGATAGCCCCCATCTATTTGGCCAGGCATTAGCCCAAGACTTGAGTC
AATTCTCATAOCTGGACACTCTTGTOCTTCAGTACATGGATGATTTACTTT
TAGTOGOCOCGTTTCAGAAACCTTGTGOCATCAAGOCACOCAAGAACTCTTAA
CTTTOCTCACTACCTGTGGCTACAAGGTTTCCAAACCAAGGCTCGGCTCT
GCTCACAGGAGATTAGATACTNAGGGCTAAAATTATOCAAAGGCAOCAGG
GOOCTCAGTGAGGAAOCTATOCAGOCATACTGGCTTATOCTCATOOCAAA
AOCTAAAGCAACTAAGAGGGTTCTTGGCATAACAGGTTTCTGOOGAAA
ACAGATTOOCAGGTACASOOCAATAGOCAGAACATTATATACACTAATTA
NGGAACTCAGAAAGOCAATAOCTATTTAGTAAGATGGACACCTACAGAA
GTGGCTTTOCAGGGOCTAAAGAAGGOCTAACOCAAGOOCCAGTGTTCAGC
TTGOC AACAGGGCAAGATTTTCTTTATATGOCACAGAAAAACAGGAAT
AGCTCTAGGAGTOCTTAOGCAGGTCTCAGGGATGAGCTTGCAAOOOGTGGT
ATAOCTGAGTAAGGAAATTGATGTAGTGGCAAAGGGTT

SEQ ID NO 8

7/23

FIG 8

10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 *
 CCC TTT GCC ACT ACA TCA ATT TTA GGA GTA AGG AAA CCC AAC GGA CAG TGG AGG TTA GTG CAA GAA CTC AGG
 P F A T T S I L G V R K P N G Q W R L V Q E L R>

 TRANSLATION OF F11-1 [A]

 80 * 90 * 100 * 110 * 120 * 130 * 140 *
 ATT ATC AAT GAG GCT GTT GTT CCT CTA TAC CCA OCT GTA OCT AAC OCT TAT ACA GTG CTT TCC CAA ATA CCA
 I I N E A V V P L Y P A V P N P Y T V L S Q I P>

 TRANSLATION OF F11-1 [A]

 150 * 160 * 170 * 180 * 190 * 200 * 210 *
 GAG GAA GCA GAG TGG TTT ACA GTC CTG GAC CTT AAG GAT GCC TTT TTC TGC ATC CCT GTA CGT CCT GAC TCT
 E E A E W F T V L D L K D A F F C I P V R P D S>

 TRANSLATION OF F11-1 [A]

 220 * 230 * 240 * 250 * 260 * 270 * 280 *
 CAA TTC TTG TTT GCC TTT GAA GAT CCT TTG AAC CCA ACG TCT CAA CTC ACC TGG ACT GTT TTA CCC CAA GGG
 Q F L F A F E D P L N P T S Q L T W T V L P Q G>

 TRANSLATION OF F11-1 [A]

290 *

TTC	AAG	GGA
F	K	G>

SEQ ID NO. 2

10 20 30 40 50 60 70

OCC TTT GCT ACT ACA TCA ATT TTA GGA GGA AGG AAA CCC AAC GGA CAG TGG AGG TTA GTG CAA GAA CTC AGG
P F A T T S I L G V R K F N G Q W R L V Q E L R>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

80 90 100 110 120 130 140

ATT ATC AAT GAG GCT GTT GTT GCT CTA TAC CCA GCT GGA CTT AAC CTT TAT ACA GTG CTT TCC CAA ATA CCA
I I N E A V V F L Y P A V P N F Y T V L S Q I P>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

150 160 170 180 190 200 210

GAG GAA GCA GAG TGG TTT ACA GTC CTG GAC CTT AAG GAT GCT TTT TTC TGC ATC CTT GTA GGT CTT GAC TCT
E E A E M F T V L D L E D A F F C I P V R P D S>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

220 230 240 250 260 270 280

CAA TTC TTG TTT GCT TTT GAA GGT CTT TTG AAC CCA AGG TCT CAA CTC ACC TGG ACT GGT TTA CCC CAA GAG
Q F L F A F E D P L N T S Q L T W T V L P Q G>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

290 300 310 320 330 340 350 360

TTC AGG GAT AGC CCC CTT CTA TTT GCT CAG GCA TTA GCT CAA GAC TTG AGT CAA TTC TCA TAC CTG GAC ACT
F R D S P N L F G Q A L A Q D L S Q F S Y L D T>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

370 380 390 400 410 420 430

CCT GCT CTT CAG TAC AGG GAT GAT TTA CTT TTA GCT GCT GAT TCA GAA ACC TTG TCC CTT CAA GCT ACC CAA
L V L Q Y N D D L L L V A R S E T L C H Q A T Q>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

440 450 460 470 480 490 500

GAA CAC TTA ACT TTC CTC ACT ACC TTT GCT TAC AGG GAT TCC AAA CCA AGG GCT CAG CTC TCC TCA CAG CAG
E L L T F L T T C G Y K V S K P K A R L C S Q D>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

510 520 530 540 550 560 570

ATT AAT TAC TTA GGG CCA AAA TTA TCC AAA GCT ACC AGG GCT CTC AGT GAG GAA GAT ACC CAG CTT AAT CAG
I R Y K G L K L S K Q T R A L S E E R I Q P I L>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

580 590 600 610 620 630 640

GCT TTT CTT GAT GCT CCA ACC CCA AGG CCA CCA AGG GTC CTT GCT AAT ACA GAT TTC TCC CCA AAA CAG
A Y F H P K T L K Q L R G F L G I T G F C R K Q>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

650 660 670 680 690 700 710 720

ATT GCT AGG TAC ACC CCA AAT GCT AAT CCA TTA TTT ACA CCA ATT AGG GAA ACT CAG AAA GCT ACC TAT
I P R Y K P I A R P L T L I X S T Q K A N T D>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

730 740 750 760 770 780 790

TTA GAA AAT TGG ACA CTT ACA GAA GAG GCT TTC CAG GCT CCA AGG AGG GCT CCA ACC CAA GCT CCA GAT TTC
L V E W T P T E V A F Q A L K K A L T Q A P V F>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

800 810 820 830 840 850 860

AGC TTG CCA ACA GGG CAA GAT TTT TCT TTA TAT GCT ACA GAA AAA ACA GGA AAT GCT CTA GCA GTC CTT AGG
S L P T G D F S L Y A T E K T G I A L G V L T>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

870 880 890 900 910 920 930

CAG GTC TCA GGG ATG AGC TTG CAA CCC GTG GTA TAC CTG AGT AAG GAA ATT GAT GTA GTG CCA AAG GGT TGG
Q V S G H S L Q P V V Y L S K E I D V V A K G W>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

940 950 960 970 980 990 1000

CCT CAT AGT TTA TGG GTA ATG GAG GCA GGA GCA GTC TGA GTA TCT GAA GCA GTT AAA ATA ATA CAG GGA AGA
P H X L W V N X A V A V X V S E A V K I I Q G R>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080

GAT CTT NCT GTG TGG ACA TCT CAT GAT GTG AAC GCT AAT CTC ACT GCT AAA GGA GAC TTG TGG TTG TCA GAC
D L X V W T S H D V N G I L T A K G D L W L S D>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150

AAC CAT TTA CTT AAT TAT CAG GCT CTA TTA CTT GAA GAG CCA GTG CTG NGA CTG GCT ACT TGT GCA ACT CTT
N H L L X Y Q A L L L E E P V L X L R C T C A T L>
TRANSLATION OF NSRV-1 POL - [A]

AAA CCC
K P>

FIG 9

SEQ ID NO 1

9/23

FIG 10

SEQ ID NO 12

10 20 30 40
* * * *
TGCAAGCTTCACCGC TTGCTGGATGTAGGC CTCAGTACCGNGTG
50 60 70 80 90
* * * *
OCCCGCGGCTGTAG TTCGATGTAGAAAGC GCCCGGAAACACGGC
100 110 120 130
* * * *
GGACCAATGGGTGCG CAGCTTGGGCGGCAG CGCCTGCTTGCCATT
140 150 160 170 180
* * * *
GGCAGGCGCACGGC GATATCAACCGGCAT GGCGCGGAGAGGCG
190 200 210 220
* * * *
CAGCAGACGGGGGC CAGCGGCGCATTCCTC AACGCGGGCTGCTC
230 240 250 260 270
* * * *
GACCATTOGGGGGC GATTTCGCGACGACC GCGATGCTGGTTGGA
280 290 300 310
* * * *
GAGCAGGGGCTGGC CAGCAACTGGCACAG GTTCAGGTAAACCTG
320 330 340 350 360
* * * *
CTGTGCGCGACCAA CAGCAGCAGGGGGGT CGGCTTGTGCGGCTC
370 380 390 400
* * * *
GTGCTGATGGTGAT CCACAGGTCAGGCCC GAGGATGGGCTTCAC
410 420 430 440 450
* * * *
GCGCTTGGCAGGGC TTCTTGTAGANGG CAACAGCGCGAAGGC
460 470 480 490
* * * *
ATTGGCGAGATGGT CAGGCGCAAGGGGCG CATGOCATCTTTGGC
500 510 520 530 540
* * * *
GGCAGGCTTGAAGGC ATCGTCGAGACGGAC ATTGCCATGACGAC
550 560 570 580
* * * *
GGAATATTCGGAGTG GAGACGGAGGTGGAC GAAGCGCGGCGAATT
590 600 610 620 630
* * * *
CATCGCGTATTGTA ACGGGTGACACCTTC CGCAAAGCATTCCGG
640 650 660 670
* * * *
ACGTGCCCCGATTGAC CCGGAGCAACCCCGC ACGGCTGCGCGGGCA
680 690 700 710 720
* * * *
GTTATAATTTCGGCT TACGAATCAACGGGT TACCCCAGGGCGCTG
730 740
* *
AAGCCTATCGGTGC AGTTGCCCGGATGC

[illegible]

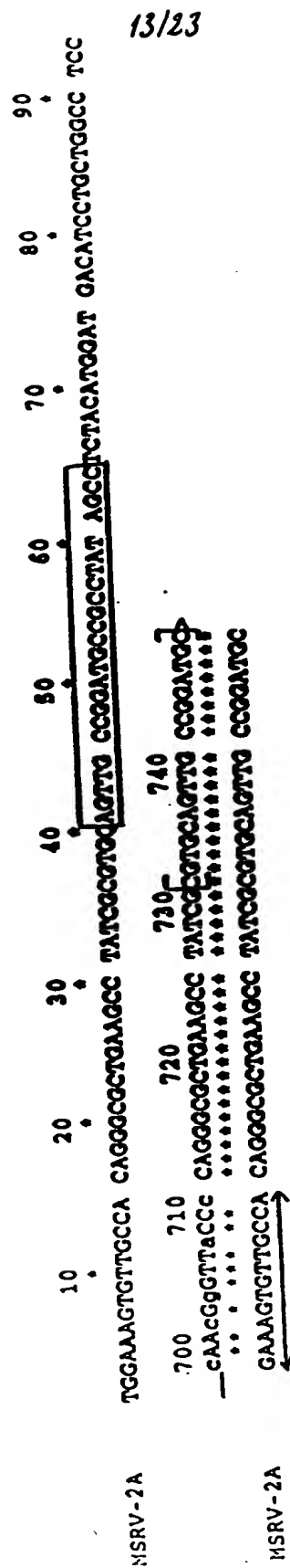
[illegible][illegible][illegible]

580
590
600
610
620
630
640
650
660
670

FIG 11

[illegible]

FIG 12



14/23

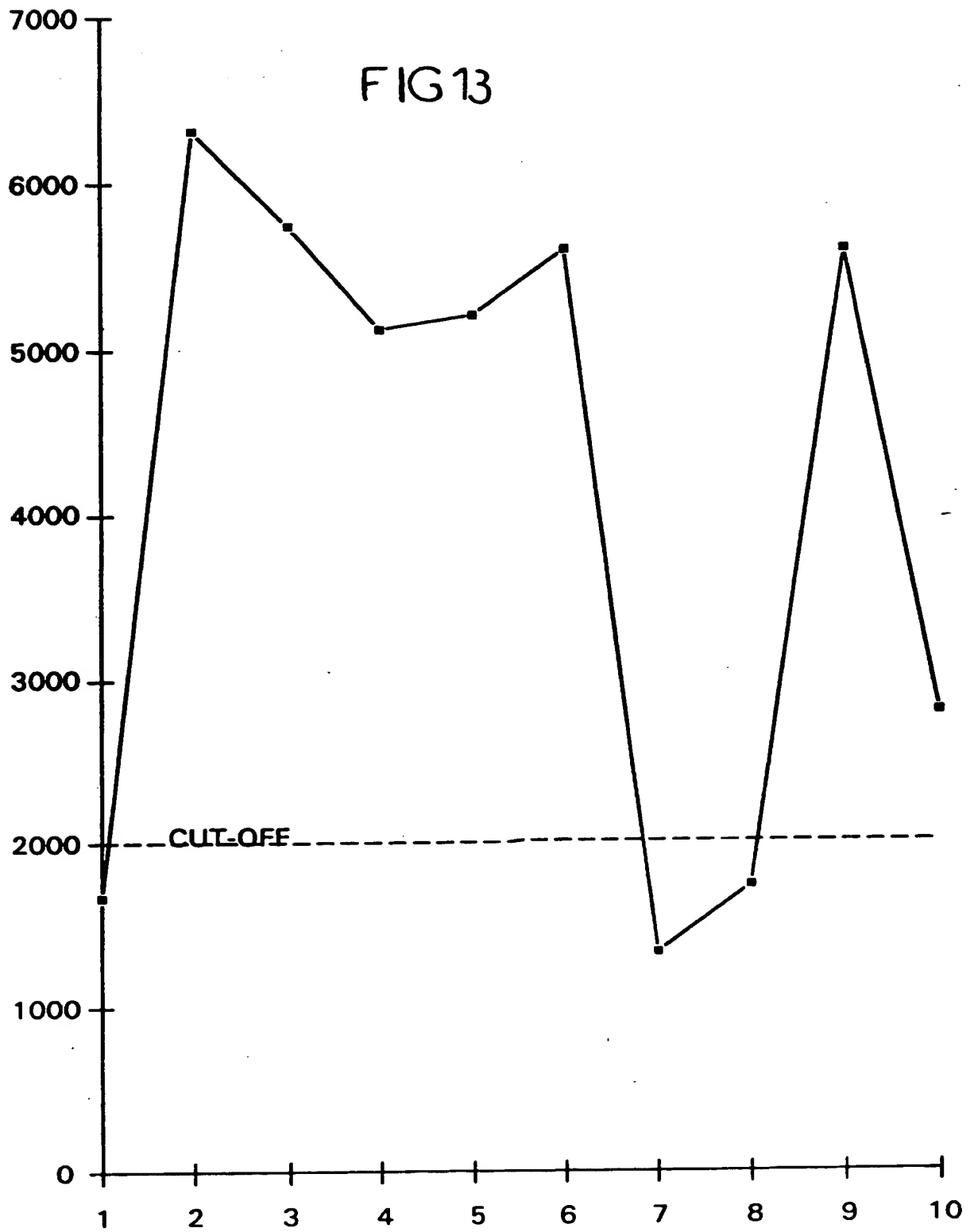


FIG14 15/23

FIG14A

GTGCTACCACAGGGGTTTCAGGGATAGCTCCCATCTATTGGCCTGACATTAAACCCGAGAC
 TTAAGCCAGTTCTCATACGTGGACACTCTTGTCCTTTGGTACGTGGATGACATCCTGCTGG
 CCTCC

FIG14 B

		10	20	30	40	50
MSRV1pol	GTGCTACCAC	AGGGGTTTCAG	GGATAGCTCC	CATCTATTTG	GCCTGACATT	
0. jmp1 st	280	290	300	310	320	
	GTttTACCCc	AaGGGTTTCAG	GGATAGCcCC	CATCTATTTG	GCcAGgCATT>	
	** *****	** *****	** *****	** *****	** *****	
	GTGCTACCAC	AGGGGTTTCAG	GGATAGCTCC	CATCTATTTG	GCCTGACATT	

	60	70	80	90	100
MSRV1pol P	AACCCGAGAC	TTAAGCCAGT	TCTCATACGT	GGACACTCTT	GTCCTTTGGT
0. jmp1 st	330	340	350	360	370
	AyCCCaAGAC	TTyAGTCAaT	TCTCATACcT	GGACACTCTT	GTCCTTcaGT>
	* ** *	** ** *	*****	*****	***** **
MSRV1pol P	AACCCGAGAC	TTAAGCCAGT	TCTCATACGT	GGACACTCTT	GTCCTTTGGT

	110	120	
MSRV1pol P	ACGTGGATGA	CATCCTGCTG	GCCTCC
0. jmp1 st	380	390	
	ACaTGGATGA	ttTaCTttTa	Gt>
	** *****	** ** *	** *
MSRV1pol P	ACGTGGATGA	CATCCTGCTG	GC

FIG14C

MSRV1pol P	GTGCTACCAC	AGGGGTTTCAG	GGATAGCTCC	CATCTATTTG	GCCTGACATT
0. jmp1 st			10	20	30
		GTTTCAG	GGATAGCTCC	CATCTATTTG	GCCTGgCATT>
		*****	*****	*****	*****
MSRV1pol P		GTTTCAG	GGATAGCTCC	CATCTATTTG	GCCTGACATT

	60	70	80	90	100
MSRV1pol P	AACCCGAGAC	TTAAGCCAGT	TCTCATACGT	GGACACTCTT	GTCCTTTGGT
0. jmp1 st	40	50	60	70	80
	AACCCGAGAC	TTAAGCCAGT	TCTCATACGT	GGACACTCTT	GTCCTTTGG>
	*****	*****	*****	*****	*****
MSRV1pol P	AACCCGAGAC	TTAAGCCAGT	TCTCATACGT	GGACACTCTT	GTCCTTTGG

	110	120	
MSRV1pol P	ACGTGGATGA	CATCCTGCTG	GCCTCC

FIG 15 ^{16/23}

FIG 15A

GTGCTGCCCCAGGGCGCTGAAGCCTATCGCGTGCAAGTTGCCGGATGCCGCCTATAGCCTCTAC
 GTGGATGACCTGCTGCTGGCCTCC

FIG 15B

		10		20		30		40		50
	*	*		*	*	*	*	*	*	*
MSRV2 PR	GTGCTGCCCC	AGGGGCGCTGA	AGCCTATCGC	GTGCAGTTGC	CGGATGCCGC					
0. jmp1 st	710	720	730	740						
	GgGtTaCCCC	AGGGGCGCTGA	AGCCTATCGC	GTGCAGTTGC	CGGATGC>					
	* * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *					
MSRV2 PR	GTGCTGCCCC	AGGGGCGCTGA	AGCCTATCGC	GTGCAGTTGC	CGGATGC					
		60		70		80				
	*	*	*	*	*	*	*			
MSRV2 PR	CTATAGCCTC	TACGTGGATG	ACCTGCTGCT	GGCCTCC						

FIG 15C

		10		20		30		40		50
	*	*		*	*	*	*	*	*	*
MSRV2 PR	GTGCTGCCCC	AGGGGCGCTGA	AGCCTATCGC	GTGCAGTTGC	CGGATGCCGC					
0. jmp1 st	10	20	30	40	50					
	GTGtTGCCaC	AGGGGCGCTGA	AGCCTATCGC	GTGCAGTTGC	CGGATGCCGC>					
	*** *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *					
MSRV2 PR	GTGCTGCCCC	AGGGGCGCTGA	AGCCTATCGC	GTGCAGTTGC	CGGATGCCGC					
		60		70		80				
	*	*	*	*	*	*	*			
MSRV2 PR	CTATAGCCTC	TACGTGGATG	ACCTGCTGCT	GGCCTCC						
0. jmp1 st	60	70	80	90						
	CTATAGCCTC	TACaTGATG	ACaTeCTGCT	GGCCTCC>						
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *						
MSRV2 PR	CTATAGCCTC	TACGTGGATG	ACCTGCTGCT	GGCCTCC						

17/23

GTAGTTCGATGTAGAAAGCGCCCGGAAACACGCGGGACCAATG
CGTCGCCAGCTTGCGCGCCAGCGCCTCGTTGCCATTGGCCAGC
GCCACGCCGATATCACCCGCCATGGCCGCCGGAGAGCGCCAGC
AGACCGGCGGCCAGCGGCGCATTCTCCAACGCCGGGCTCGTTCG
AATCATTCGGGGGGCGATTTCCCCACGACCGCGATGCTGGTTGG
AGAGCCAGGCCCTGGCCAGCAACTGGCACAGGTTTCAGGTAACC
CCTGCTTGTCGCCCGCACCCAACAGCAGCAGGCGGGTCGGCTTG
TCGCGCTCGTCCGTGATTGGTGGATCCACAACGTCAGCCCCGA
CGATGGGCTTCACGCCCTTGCCACGCGCTTCCTTGTAAGCGC
ACCAGCCCGGAAGGCATTGGCGAGATCGGTCAAGCGCCAAGGN
SCCCCATGCCATCTTTGGCGGCAGGCCTTGACGGCATCGTCGAG
ACGGACATTGCCATCGACCGACGGAATATTCGGAGTGGAGACG
GAGGTGGACGAAGCGCGGCGAATTCATCCGCGTATTGTAACGG
GTGACACCTTCCCCAAAGCATTCCGGGCGTGCCCGATTGACCC
GGAGCAACCCCGCACGGCTGCGCGGGCAGTTATAATTCGGCT
TACGAATCAACGGGTTACCCAGGGCGCTGAAGCCTATCGCGT
GCAGTTGCCGGATGC

FIG 16

18/23

	10	20	30	40	50	60
MSRV-2A	TGGAAGTGT	TGCCACAGGG	CGCTGAAGCC	TATCGCGTGC	AGTTGCCGGA	TGCCGCCTAT
MSRV2cPR	-tCAACGgGT	TaCCcCAGGG	CGCTGAAGCC	TATCGCGTGC	AGTTGCCGGA	TGC>
MSRV-2A	GGAAAGTGT	TGCCACAGGG	CGCTGAAGCC	TATCGCGTGC	AGTTGCCGGA	TGC

FIG 17

FIG 18

19/23

```

      10      20      30      40      50      60
MSRV2c PR  GTAGTTCGAT GTAGAAAGCG CCOGGAAACA CGCGGGACCA ATCGGTGGCC AGCTTGGCGG
0. jmp1 st 60      70      80      90      100     110
      GTAGTTCGAT GTAGAAAGCG CCOGGAAACA CGCGGGACCA ATCGGTGGCC AGCTTGGCGG>
      *****
MSRV2c PR  GTAGTTCGAT GTAGAAAGCG CCOGGAAACA CGCGGGACCA ATCGGTGGCC AGCTTGGCGG

      70      80      90      100     110     120
MSRV2c PR  CCGCGGCTTC GTTGCCATTG GCCAGGCGCA CGCGGATATC ACCCGCCATG GCGCGCGGAG
0. jmp1 st 120     130     140     150     160     170
      CCGCGGCTTC GTTGCCATTG GCCAGGCGCA CGCGGATATC ACCCGCCATG GCGCGCGGAG>
      *****
MSRV2c PR  CCGCGGCTTC GTTGCCATTG GCCAGGCGCA CGCGGATATC ACCCGCCATG GCGCGCGGAG
0. jmp1 st
      160     170
      t ccccgccat GgCGCGGAG>
      ..
MSRV2c PR  C ACCCGCCATG GCGCGCGGAG

      130     140     150     160     170     180
MSRV2c PR  AGCGCCAGCA GACCGGCGGC CAGCGGCGCA TTCTCCAAGC CCGGGCTCGT CGAATCATTG
0. jmp1 st
      gc>
MSRV2c PR  AG
0. jmp1 st 180     190     200     210     220
      AGCGCCAGCA GACCGGCGGC CAGCGGCGCA TTCTCCAAGC CgGGC>
      *****
MSRV2c PR  AGCGCCAGCA GACCGGCGGC CAGCGGCGCA TTCTCCAAGC CCGGG
0. jmp1 st
      200     210     220     230
      agcgggc attctccaag cgggctcgt CGAATCATTG>
      *****
MSRV2c PR  CCGGCGCA TTCTCCAAGC CCGGGCTCGT CGAATCATTG

      190     200     210     220     230     240
MSRV2c PR  GGGGGCGATT TCCCAAGAC CGCGATGCTG GTTGGAGAGC CAGGCCCTGG CCAGCAACTG
0. jmp1 st 240     250     260     270     280     290
      GGGGGCGATT TCCCAAGAC CGCGATGCTG GTTGGAGAGC CAGGCCCTGG CCAGCAACTG>
      *****
MSRV2c PR  GGGGGCGATT TCCCAAGAC CGCGATGCTG GTTGGAGAGC CAGGCCCTGG CCAGCAACTG

      250     260     270     280     290     300
MSRV2c PR  GCACAGGTTG AGGTAACCCC TGCTTGTCCT CGCACCAAC AGCAGCAGGC GGGTCGGCTT
0. jmp1 st 300     310     320
      GCACAGGTTG AGGTAACCCt gctTgtcCC>
      *****
MSRV2c PR  GCACAGGTTG AGGTAACCCC TGCTTGTCCT
0. jmp1 st
      320     330     340     350     360
      tgctTgtC CcgcaCCAAC AGCAGCAGGC GGGTCGGCTT>
      ..
MSRV2c PR  CTGTGTCCT CGCACCAAC AGCAGCAGGC GGGTCGGCTT

      310     320     330     340     350     360
MSRV2c PR  GTCGCGCTCG TCCGTGATTG GTGGATCCAC AACGTCAGCC CCGACGATGG GCTTCACGCC

```

20/23

```

0. jmpl st      360|      370|      tg>
      GTGGCGCTCG TCgtgatTgG
MSRV2c PR      GTGGCGCTCG TCCGTGATTG GT

0. jmpl st      370      380      390      400
      at tgGtgatCca cAGGTCAGCC CCGACGATGG GCTTCACGCC>
MSRV2c PR      TG GTGGATCCAC AACGTCAGCC CCGACGATGG GCTTCACGCC

      370      380      390      400      410      420
MSRV2c PR      CTTGCCACGC GCTTCCTTGT AGAAGCGCAC CAGCCCGGAA GGCATTGGCG AGATCGGTCA

0. jmpl st 410      420      430      440      450
      CTTGCCACGC GCTTCCTTGT AGAAGCGCAC CAGCCCGGAA GcatTgG>
MSRV2c PR      CTTGCCACGC GCTTCCTTGT AGAAGCGCAC CAGCCCGGAA GGCATTG

0. jmpl st      440      450      460
      ngcgca CcagCCcGAA GGCATTGGCG AGATCGGTCA>
MSRV2c PR      GCGCAC CAGCCCGGAA GGCATTGGCG AGATCGGTCA

      430      440      450      460      470      480
MSRV2c PR      AGCGCCAAGG NSCCCCATGC CATCTTTGGC GGCAGGCGCTT GACGGCATCG TOGAGACCGA

0. jmpl st 470
      ggcCaAgCc>
MSRV2c PR      AGCGCCAAGG

0. jmpl st 470      480      490      500      510
      cagcgCcAag ggcCCCATGC CATCTTTGGC GGCAGGCGCTT acgGc>
MSRV2c PR      AGCGCCAAGG NSCCCCATGC CATCTTTGGC GGCAGGCGCTT GACGG

0. jmpl st      490      500      510      520
      atcTtGg cGgcAGGCTT GACGGCATCG TOGAGACCGA>
MSRV2c PR      TCTTTGGC GGCAGGCGCTT GACGGCATCG TOGAGACCGA

      490      500      510      520      530      540
MSRV2c PR      CATTGCCATC GACCGACCGA ATATTCCGAG TOGAGACCGA GGTGGACGAA GCGCGGCGAA

0. jmpl st 530      540      550      560      570      580
      acatTgCeat ggcCGACCGA ATATTCCGAG TOGAGACCGA GGTGGACGAA GCGCGGCGAA>
MSRV2c PR      CATTGCCATC GACCGACCGA ATATTCCGAG TOGAGACCGA GGTGGACGAA GCGCGGCGAA

0. jmpl st 530      540
      CATTGCCATC GACgagGaa tat>
MSRV2c PR      CATTGCCATC GACCGACCGA ATA

      550      560      570      580      590      600
MSRV2c PR      TTCATCCGCG TATTGTAACG GGTGACACCT TCCCAAAGC ATTCCGGGCG TGCCCGATTG

0. jmpl st 590      600      610      620      630      640
      TTCATCCGCG TATTGTAACG GGTGACACCT TCCgCAAAGC ATTCCGgCG TGCCCGATTG>
MSRV2c PR      TTCATCCGCG TATTGTAACG GGTGACACCT TCCCAAAGC ATTCCGGGCG TGCCCGATTG

      610      620      630      640      650      660
MSRV2c PR      ACCCGGAGCA ACCCGGCACG GCTGCGCGGG CAGTTATAAT TTCGGCTTAC GAATCAACGG

0. jmpl st 650      660      670      680      690      700

      ACCCGGAGCA ACCCGGCACG GCTGCGCGGG CAGTTATMAT TTCGGCTTAC GAATCAACGG>
MSRV2c PR      ACCCGGAGCA ACCCGGCACG GCTGCGCGGG CAGTTATAAT TTCGGCTTAC GAATCAACGG

      670      680      690      700
MSRV2c PR      GTTACCCAG GCGGCTGAAG CCTATCGCGT GCAGTTGCCG GATGC

0. jmpl st 710      720      730      740
      GTTACCCAG GCGGCTGAAG CCTATCGCGT GCAGTTGCCG GATGC>
MSRV2c PR      GTTACCCAG GCGGCTGAAG CCTATCGCGT GCAGTTGCCG GATGC

```

21/23

CAGGGTATAGCCCCATCTATTTGGCCAGGCATTAGCCCAAGA
CTTGAGCCAGTTCTCATACCTGGACACTCTTGTCCTTCAGTATA
TGGATGATTTACTTTTAGTGACCCATTCAGAAACCTTGTGATGT
CAAGCCACACAAGTGCTCTTAACCTTTCCTCTTTACCTCTGGCTA
CAAGGTTTTCAAACCAAAGGCTCAGCTCTGCTCACAGCAGGTT
AAATATTTAGGGCTAAAATTATCCAAAGGCACCAGGGCCCTCA
GTGAGGAACGTATCCAGCCTATACTGGCTTATCTTCATCCCAA
ACCCTAAAGCAACTAAGAGGGTTCCTTGGCATAACAGGCTTCT
GCTGAATATGGATTCCCAGGTTYGGTGAAATAGCCAGGCCATT
AAATACACTAATTAAGGAACTCAGAAAGCCAATACCCATTTA
GTAAGATGGACATCTGAAGCACAATCAGCTTTCCAGGCACTAA
AGAAAGCCCTAACCCAAGCCCCAGTGTTAAGCTTGCCAACAGG
GCAAGACTTTTCTTTATATGTCACAGAAAAAATAGGAATAGCTC
TAGGAGTCCTTACACAGGTCTGAGGGACAAGCTTGCAACCCGT
GGCATATCTGAGTAAGGARRCTGATGTAGTGGCAAAGGGTT

FIG 19

22/23

FIG 20

ALIGNEMENT SEQ ID N°1 avec le clone PR SEQ ID N°XX

```

      10      20      30      40      50      60
MSRV1aPR  CAGGGTATAG CCCCCATCTA TTTGGCCAGG CATTAGCCCA AGACTTGAGC CAGTTCTCAT
0. jmpl 290      300      310      320      330      340
      tcaGGGATAG CCCCCATCTA TTTGGCCAGG CATTAGCCCA AGACTTGAGC CAGTTCTCAT>
      .. ..
MSRV1aPR  CAGGGTATAG CCCCCATCTA TTTGGCCAGG CATTAGCCCA AGACTTGAGC CAGTTCTCAT

      70      80      90      100     110     120
MSRV1aPR  ACCTGGACAC TCTTGTCTT CAGTATATGG ATGATTTACT TTTAGTGACC CATTGAGAAA
0. jmpl 350      360      370      380      390      400
      ACCTGGACAC TCTTGTCTT CAGTATATGG ATGATTTACT TTTAGTGACC CATTGAGAAA>
      .. ..
MSRV1aPR  ACCTGGACAC TCTTGTCTT CAGTATATGG ATGATTTACT TTTAGTGACC CATTGAGAAA

      130     140     150     160     170     180
MSRV1aPR  CCTTGTGATG TCAAGCCACA CAAGTGCTCT TAACTTTCTT CTTTACCTCT GGCTACAAGG
0. jmpl 410     420     430     440     450     460
      CCTTGTGATG TCAAGCCACC CAAGaACTCT TAACTTTCTT CactACCTCT GGCTACAAGG>
      .. ..
MSRV1aPR  CCTTGTGATG TCAAGCCACA CAAGTGCTCT TAACTTTCTT CTTTACCTCT GGCTACAAGG

      190     200     210     220     230     240
MSRV1aPR  TTTTCAAACC AAAGGCTCAG CTCGTCTCAC AGCAGGTTAA ATATTTAGGG CTAAAATTAT
0. jmpl 470     480     490     500     510     520
      TTTTCAAACC AAAGGCTCgG CTCGTCTCAC AGgAGATTAg ATActnAGGG CTAAAATTAT>
      .. ..
MSRV1aPR  TTTTCAAACC AAAGGCTCAG CTCGTCTCAC AGCAGGTTAA ATATTTAGGG CTAAAATTAT

      250     260     270     280     290     300
MSRV1aPR  CCAAAGGCAC CAGGGCCCTC AGTGAGGAAC GTATCCAGCC TATACTGGCT TATCTTCATC
0. jmpl 530     540     550     560     570     580
      CCAAAGGCAC CAGGGCCCTC AGTGAGGAAC GTATCCAGCC TATACTGGCT TATCCTCATC>
      .. ..
MSRV1aPR  CCAAAGGCAC CAGGGCCCTC AGTGAGGAAC GTATCCAGCC TATACTGGCT TATCTTCATC

      310     320     330     340     350     360
MSRV1aPR  CCAAAACCTT AAAGCAACTA AGAGGGTTCC TTGGCATAAC AGGCTTCTGC TGAATATGGA
0. jmpl 590     600     610     620     630     640
      CCAAAACCTT AAAGCAACTA AGAGGGTTCC TTGGCATAAC AGGtTTCTGC cGAAaAcAGa>
      .. ..
MSRV1aPR  CCAAAACCTT AAAGCAACTA AGAGGGTTCC TTGGCATAAC AGGCTTCTGC TGAATATGGA

      370     380     390     400     410     420
MSRV1aPR  TTCCCAAGGT YGGTGAAATA GCCAGGCCAT TAAATACACT AATTAAGGAA ACTCAGAAAG
0. jmpl 650     660     670     680     690     700
      TTCCCAAGGTa cascccAATA GCCAGaCCAT TAtATACACT AATTAnGGAA ACTCAGAAAG>

```

23/23

```

***** * * ***** * * * * *
MSRVlnPR TTCCAGGTT YGGTGAATA GCCAGGCCAT TAAATACACT AATTAAAGAA ACTCAGAAG

```

	430	440	450	460	470	480
MSRVlnPR	CCAATACCCA	TTTAGTAAGA	TGGACATCTG	AAGCACAATC	AGCTTTCCAG	GCACTAAAGA
0. jmpl st				740	750	760
				ctaCagaAgt	ggCTTTCCAG	GCCCTAAGA>
				** **	*****	** *****
MSRVlnPR				AAGCACAATC	AGCTTTCCAG	GCACTAAAGA
0. jmpl	710	720	730	740		
	CCAATACCCA	TTTAGTAAGA	TGGACACCTa	cAGaAgtgg>		
	*****	*****	*****	** **		
MSRVlnPR	CCAATACCCA	TTTAGTAAGA	TGGACATCTG	AAGCACAATC		

	490	500	510	520	530	540
MSRVlnPR	AAGCCCTAAC	CCAAGCCCCA	GTGTTAAGCT	TGCCAACAGG	GCAAGACTTT	TCITTATATG
0. jmpl st	770	780	790	800	810	820
	AgCCCTAAC	CCAAGCCCCA	GTGTTcAGCT	TGCCAACAGG	GCAAGAtTTT	TCITTATATG>
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
MSRVlnPR	AAGCCCTAAC	CCAAGCCCCA	GTGTTAAGCT	TGCCAACAGG	GCAAGACTTT	TCITTATATG

	550	560	570	580	590	600
MSRVlnPR	TCACAGAAAA	AATAGGAATA	GCTCTAGGAG	TOCTTACACA	GGTCTGAGGG	ACANGCTTGC
0. jmpl st	830	840	850	860	870	880
	CCACAGAAAA	AACAGGAATA	GCTCTAGGAG	TOCTTACaCA	GGTCTcAGGG	AtgAGCTTGC>
	*****	** *****	*****	*****	*****	** *****
MSRVlnPR	TCACAGAAAA	AATAGGAATA	GCTCTAGGAG	TOCTTACACA	GGTCTGAGGG	ACANGCTTGC

	610	620	630	640	
MSRVlnPR	AACCCGTGGC	ATATCTGAGT	AAGGARRCTG	ATGTAGTGGC	AAAGGGTT
0. jmpl st	890	900	910	920	930
	AACCCGTGGt	ATAcCTGAGT	AAGGAaetTG	ATGTAGTGGC	AAAGGGTT>
	*****	** *****	*****	*****	*****
MSRVlnPR	AACCCGTGGC	ATATCTGAGT	AAGGARRCTG	ATGTAGTGGC	AAAGGGTT

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concurrenees de la demande examinee
Categorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 36, no. 9supl, 1993 page S55 J.L. PABLOS ET AL 'A novel retroviral POL sequence is present in patients with rheumatoid arthritis' résumé n° 102 & AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY 57TH ANNUAL SCIENTIFIC MEETING, 7 - 11 Novembre 1993 SAN ANTONIO, TEXAS ; USA., ---	1-27
A	WO-A-94 28138 (UNIVERSITY COLLEGE LONDON) le document en entier plus particulièrement la sequence ID 4 page 20 ---	14-16, 18,19
D,A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 19, no. 7, 1991 OXFORD GB, pages 1513-1520, G. LA MANTIA ET AL 'Identification and characterization of novel human endogenous retroviral sequences preferentially expressed in undifferentiated embryonal carcinoma cells' * le document en entier * ---	1-27
A,D	WO-A-93 20188 (BIO MERIEUX) ---	
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 12, Décembre 1994 pages 7840-7849, Y.S. LIE ET AL 'Chinese hamster ovary cells contain transcriptionally active full length type C proviruses' * figure 2 * ---	3,6,7
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
5 Décembre 1995		Le Cornec, N
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire T : théorie en principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 511199
FR 9502960

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 63, no. 1, Janvier 1989 pages 64-75, A. SHIH ET AL 'Detection of Multiple, novel reverse transcriptase coding sequences in human nucleic acids: Relation to primate retroviruses' * figure 1 *	14, 15
A	VIROLOGY, vol. 158, no. 1, Mai 1987 ORLANDO US, pages 88-102, J. MERREGAERT ET AL 'Nucleotide sequence of a radiation Leukemia virus genome' * page 1 *	3, 6-8
D, A	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 31, no. 6, Juin 1993 pages 1444-1449, F. MALLET ET AL 'Enzyme-linked Oligosorbent Assay for detection of Polymerase chain reaction-amplified human immunodeficiency virus type 1'	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
5 Décembre 1995		Le Cornec, N
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons Δ : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 (12.92) (P/C13)